

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Nisu ja maisi õhulõhede juhtivuse, regulatsiooni ning fotosünteesi võrdlev analüüs**

Bakalaureusetöö

Lõputöö maht (12 EAP)

Egon Meigas

Juhendaja      vanemteadur Ebe Merilo, PhD

TARTU 2017

## INFOLEHT

Nisu ja maisi õhulõhede juhtivuse, regulatsiooni ning fotosünteesi võrdlev analüüs.

Nisu ja mais on globaalselt kolme kõige tähtsama teravilja hulgas. Tagamaks kasvavale inimpopulatsioonile piisavalt toitu, oleks vaja taimede saagikust tõsta. Selleks tuleb uurida õhulõhede regulatsiooni ning fotosünteesi mitte ainult mudeltaimedel, vaid eelkõige teraviljadel. Käesolevas töös on uuritud ning võrreldud nisu ja maisi õhulõhede juhtivust ning fotosünteesi kiirust normaaloludes ning nende reaktsioone taimehormoon abstsissiinile (ABA), osoonile ning süsihappegaasi kontsentratsioonile. Selgus, et võrreldes nisuga, iseloomustavad maisi oluliselt madalam õhulõhede juhtivus tavaolukorras, fotosünteesi väiksem tundikkus CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni suhtes ning õhulõhede tolerantus kasutatud ABA kontsentratsiooni suhtes. Mõlema liigi fotosünteesid tavaolukorras olid võrdsed, samuti reageerisid mõlemad osoonile.

Märksõnad: nisu, mais, osoon, süsihappegaas, abstsissiin

CERCS: B310 Soontaimede füsioloogia

Stomatal conductance, its regulation and photosynthesis in *Zea mays* and *Triticum aestivum*

Wheat and maize belong to the trio of most important crops in the world. Crop production needs to increase to feed the growing human population. To achieve that, it is important to study stomatal regulation and photosynthesis not only in model plants, but above all, in cereals. In the current study, stomatal conductance and net assimilation rate of wheat and maize were measured in normal conditions, as also their responses to plant hormone abscisic (ABA) and to changes in CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> concentrations. It was found, that maize is characterized by significantly lower stomatal conductance in normal conditions, reduced sensitivity of photosynthesis to CO<sub>2</sub> concentration and stomatal tolerance to the ABA concentration used. Net assimilation rate in normal conditions and O<sub>3</sub>-responsiveness were similar in both species.

Key words: wheat, maize, ozone, carbon dioxide, abscisic acid,

CERCS: B310 Physiology of vascular plants

# SISUKORD

SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
KIRJANDUSLIK TAUST .....	6
1.1. Ajalugu.....	6
1.2. Nisu on C <sub>3</sub> -fotosünteesi esindaja .....	7
1.3. Mais on C <sub>4</sub> -fotosünteesi esindaja.....	8
1.4. Maisi ja nisu globaalne olulisus.....	9
1.5. Osooni mõju taimedele .....	10
1.6. Õhulõhed.....	11
1.7. Õhulõhede regulatsioon abstsiihappe, CO <sub>2</sub> ja O <sub>3</sub> mõjul.....	12
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	15
2.1. Töö eesmärgid.....	15
2.2. Taimede kasvatamine .....	15
2.3. Aparatuur .....	16
2.4. Katsete läbiviimine .....	18
2.5. Andmeanalüüs .....	18
2.6. Tulemused.....	19
2.6.1. Õhulõhede ja fotosünteesi reaktsioon süsihappegaasile.....	20
2.6.2. Õhulõhede reaktsioon abstsiihappele.....	22
2.6.3. Õhulõhede ja fotosünteesi reaktsioon osoonile .....	23
2.7. Arutelu .....	25
2.7.1. Süsihappegaasi katse .....	25
2.7.2. Abstsiihappe katse .....	26
2.7.3. Osooni katse .....	27
2.7.4. Üldised järeldused .....	29
KOKKUVÕTE .....	30
SUMMARY .....	31
TÄNUAVALDUSED.....	32
KIRJANDUSE LOETELU.....	33
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	39
LIHTLITSENTS.....	40

## KASUTATUD LÜHENDID

[CO<sub>2</sub>] – süsihappegaasi kontsentratsioon

3PGA – 3-fosfoglutseraat

ABA – abstsiihape

Anet – fotosünteesi kiirus

CA – CARBONIC ANHYDRASE

gs – õhulõhede juhtivus

H<sup>+</sup>-ATPaas – ATP energiat vajav H<sup>+</sup> kanal

HT1 - HIGH LEAF TEMPERATURE 1

MPK12 – MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 12

MPK4 – MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 4

NADP-ME – malaadi dehüdrogenaas

NO<sub>x</sub> - lämmastikoksiidid

OAA – oksaalatsetaat

OST1 – OPEN STOMATA 1

PEP - fosfoenoolpüruvaat

PEPC – fosfoenoolpüruvaadi karboksülaas

PKABA1 – ABA-toimeline proteiinkinaas

PP2C – PROTEIN PHOSPHATASE TYPE 2C

PPFD – fotosünteesiliselt aktiivne kiirgus

PYL – PYR1-LIKE

PYR – PYRABACTIN RESISTANCE

QUAC1 – QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL 1

RCAR - REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR

ROS – reaktiivsed hapniku ühendid

Rubisco – ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaas

RuBP – ribuloos-1,5-bisfosfaat

SLAC1 – SLOW ANION CHANNEL 1

SLAH3 – SLAC1 HOMOLOGUE 3

ZmOST1 – Zea Mays OPEN STOMATA 1

WUE – veekasutus efektiivsus

## SISSEJUHATUS

Nisu (*Triticum aestivum*) ja mais (*Zea mays*) on pika ajalooga ning inimkonnale suure tähtsusega teraviljad. Mõlemaid tarvitatakse toiduks või muuks tarbeks suurtes kogustes üle kogu maailma. Seetõttu paneb rahvaarvu kasv teraviljadele ja põllumajandusele üldisemalt väga suure koormuse. Kliima soojenemine, süsihappegaasi taseme tõus ning tööstuslik saaste samas muudavad taimede käitumist ning on oluline teada, kuidas ja mis suunas. Taimede gaasivahetus ümbritseva keskkonnaga määrab läbi fotosünteesi ja transpiratsiooni nende produktiivsuse ja stressitaluvuse. Seetõttu on gaasivahetustunnuste, nagu õhulõhede juhtivus, süsihappegaasi sidumise kiirus ning veekasutuse efektiivsus uurimine väga oluline. Gaasivahetus toimub läbi õhulõhede ehk pooride, mis asuvad taimelehtede pinnal. Sedasi omastab taim eluks vajaliku süsihappegaasi, kuid läbi nende pooride kaotab taim ka vett. Peamiseks gaasivahetuse uurimisobjektiks oma kasvukiiruse ja genoomi väiksuse tõttu on mudeltaim müürlook (*Arabidopsis thaliana*) ning viimase paari aastakümne jooksul on müürlooka uurides jõutud oluliste läbimurreteni taimede õhulõhe regulatsiooni ja signalisatsiooniradade selgitamisel. Seevastu teraviljade kohta on vähem andmeid ja kui arvestada maisi ja nisu tähtsust praegu ja ka tulevikus, on nende uurimine väga oluline.

Peamiseks abitootiliseks stressoriks taimedele on põud, stressivastust põuale vahendab taimedes molekulaarsel tasemel stressihormoon abstsissihape (ABA). Atmosfääri CO<sub>2</sub> ja O<sub>3</sub> kontsentratsioonid on samuti tõusuteel, seega on vaja teada taimede fotosünteesi ja õhulõhede regulatsiooni reaktsioone keskkonnatingimuste muutumisele.

Antud töö eesmärgiks oli uurida, kuidas erineb maisi ja nisu gaasivahetus normaaltingimustel, ning kuidas mõjutavad erinevad stiimulid maisi ja nisu õhulõhede juhtivust, regulatsiooni ja fotosünteesi. Katseid tehti unikaalses gaasivahetussüsteemis, mis võimaldab mõõta terveid võrseid. Eksperimentide jaoks kasvasin maisi ja nisu samadel tingimustel ning mõõtsin nende õhulõhede juhtivust ja fotosünteesi kiirust normaaltingimustes ning vastusena CO<sub>2</sub> ja O<sub>3</sub> kontsentratsioonide muutumisele ning ABAGA pritsimisele.

Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi Taimesignaalide uurimisrühmas.

# KIRJANDUSLIK TAUST

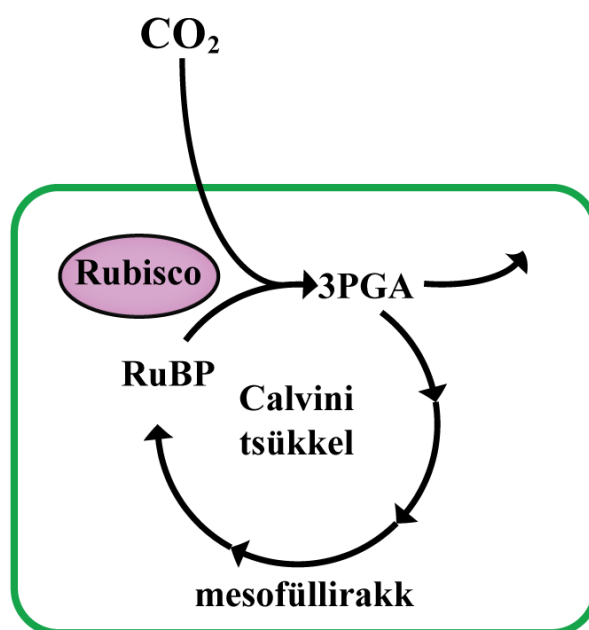
## 1.1. Ajalugu

*Zea mays* ehk harilik mais on üheaastane rohhtaim, mis kuulub kõrreliste sugukonda maisi perekonda. Arvatakse, et mais oli üks esimesi taimi, mida inimene hakkas teadlikult toiduks kultiveerima 7000 - 10000 aastat tagasi. Maisi kodukohaks peetakse arheoloogiliste leidude põhjal Mehhikot, kuid võimalikeks pärinemispaikadeks võivad olla ka Aasia ja Lõuna-Ameerika (Piperno ja Flannery, 2001). Algsed maisiliinid ei olnud välimuselt ligilähedasedki tänapäeval kommertsiaalselt kultiveeritavate sortidega. Tuhandeid aastaid kestnud kodustamise käigus aretasid farmerid aina suuremate tõlvikutega variante, mis ühel hetkel tegid maisist väga produktiivse toiduallika (Ranum jt., 2014). Tänapäeval kasvatatakse erinevaid maisi sorte üle kogu maailma, peamiseks erinevusteks nende vahel on terade värvus.

*Triticum aestivum* ehk harilik nisu on üheaastane rohhtaim, mis kuulub kõrreliste sugukonda nisu perekonda. *T. aestivum* erineb teistest liikidest peamiselt kromosoomide arvu poolest. Hariliku nisu genoom on heksaploidne, see tähendab, et tal on 6 paari kromosoomi (IWGSC, 2014). Esimesed tõendid nisu (*Triticum*) liikide kodustamisest jäävad 10000 aasta tagusesse aega (Shewry, 2009). Kõige tõenäolisemalt pärineb nisu Lähis-Idast, kuna ka tänapäeval leidub seal nisule sarnaseid metsikuid kõrrelisi. Kuigi harilik ehk pehme nisu (*Triticum aestivum*) oli olemas juba põllupidamise algusaegadest, kasvatati algul kõige enam selliseid niusid nagu emmer (*Triticum dicoccum*) ja einkorn (*Triticum monococcum*). Need liigid levisid eelisjärjekorras ka Lõuna-Euroopasse, sealt omakorda üle kogu Euroopa ning ka Aasiasse (Lupton, 1987). Rooma Impeeriumis peeti pehmet nisu, mida Põhja-Euroopas sel ajal kasvatati, umbrohuks ning kasutati söögiks peamiselt emmerit ja einkorni, samas kui Aasias oli nisu diversiteet palju suurem. Alles siis, kui nõudlus jahust tehtud küpsetiste järgi tõusis, kogus *T. aestivum* populaarsust, aga seegi jäi lühikeseks Rooma Impeeriumi languse tõttu (Evans ja Peacock, 1981). Tänapäevaks on harilikust nisust saanud kõige enam kasvatatud nisu liik (Marcussen jt., 2014)

## 1.2. Nisu on C<sub>3</sub>-fotosünteesi esindaja

Nisu kuulub C<sub>3</sub>-taimede kategooriasse, mis moodustavad ligi 95% kogu maailma taimsest biomassist (Raven ja Edwards, 2001; Ziska, 2008). C<sub>3</sub>-taimed lülitavad atmosfäärist läbi õhulõhede sisse võetud süsihappegaasi otse Calvini tsükliks ensüüm Rubisco (Ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaas) abil (Joonis 1). Calvini tsükliks seotakse süsihappegaasilt võetud süsinik ribuloos-1,5-bisfosfaadile (RuBP), mis omakorda annab kaks molekuli 3-fosfoglutseraati ehk 3PGA. C<sub>3</sub>-taimedel toimub see mesofüllirakkudes. 3PGA-d kasutab taim seejärel elutegevuseks vajalike ühendite sünteesimiseks (Ros jt., 2014).



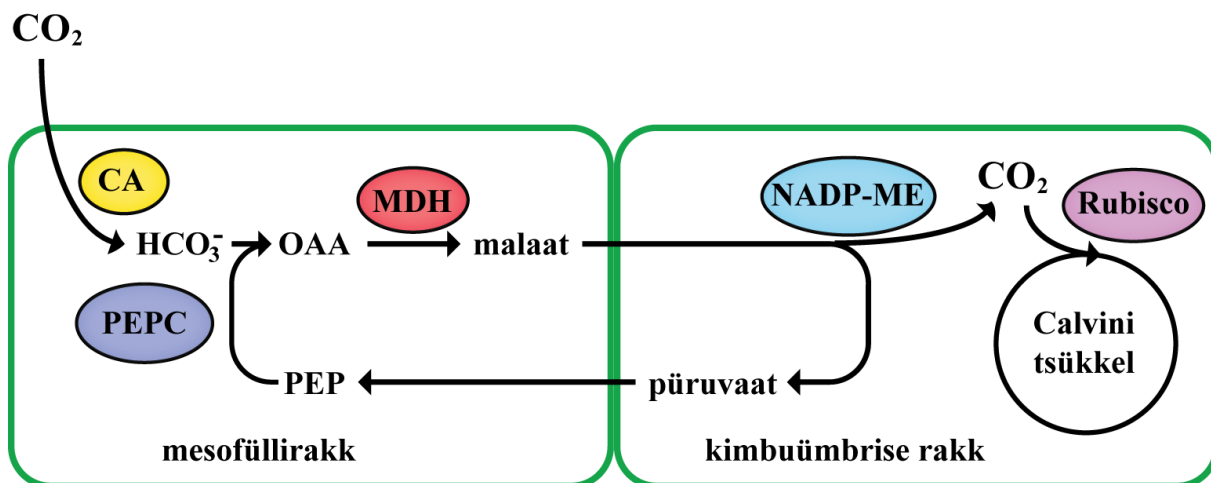
Joonis 1. C<sub>3</sub>-taimede lihtsustatud süsiniku sidumise skeem. Atmosfäärist difundeerub mesofüllirakku CO<sub>2</sub>, mis seotakse Rubisco abil ribuloos-1,5-bisfosfaadile (RuBP). Tekib kaks molekuli 3-fosfoglutseraati (3PGA), mida kasutab taim Calvini tsükli käimas hoidmiseks ja elutegevuseks vajalike ühendite sünteesiks. Originaaljoonis

Rubisco ja Calvini tsükkel kujunesid välja ajal, mil CO<sub>2</sub> kontsentratsioon atmosfääris oli kõrgem ning hapniku tase madalam kui praegu, sellest tulenevalt on nendel taimedel komplikatsioonid praeguses kliimas (Ehleringer jt., 1991). Peamiseks fotosünteesi efektiivsuse langetajaks C<sub>3</sub>-taimedel on fotorespiratsioon, mille käigus lülitatakse Rubisco abil RuBP-le CO<sub>2</sub> asemel O<sub>2</sub>. Fotorespiratsioon, lisaks sellele, et see on energianõudlik protsess, viib ka süsihappegaasi kaoni. Fotosünteesi efektiivsus kõrge temperatuuri ja veepuuduse juures võib fotorespiratsiooni tõttu langeda kuni 40% (Gowik ja Westhoff, 2011).

### 1.3. Mais on C<sub>4</sub>-fotosünteesi esindaja

C<sub>4</sub>-taimede fotosüntees on oma põhiolemuselt C<sub>3</sub>-fotosünteesi edasiarendus. See kohastumus võimaldab kõrgemat fotosünteesilist efektiivsust tugeva valgusintensiivsuse, kõrge temperatuuri ja veepuuduse juures. Just seetõttu domineerivad C<sub>4</sub>-taimed troopilistes piirkondades (Rao jt., 2016).

Efektiivsem CO<sub>2</sub> sidumine saavutatakse CO<sub>2</sub> fikseerimise jagamisega kahe rakutüübi vahel. Mesofüllirakud võtavad läbi õhulõhede lehte sisenenud süsihappegaasi vastu ning kimbuümbrise rakkudes toimub CO<sub>2</sub> lülitamine Calvini tsükliks (Joonis 2). Kõigepealt muudetakse mesofüllirakkudes süsihappegaas karboanhüdraasi (CA) abil bikarbonaadiks (Badger ja Price, 1994). See omakorda lülitub fosfoenoolpüruvaadi karboksülaasi (PEPC) abil PEPile, tekib 4-süsinikuline ühend oksaalatsetaat (OAA; O’Leary jt., 1981). Edasiste mehhanismide variatsioone on mitmeid, kuid maisi puhul on see ühend, mis transporditakse mesofüllist kimbuümbrise rakkudesse, malaat. See saadakse OAA-st malaadi dehüdrogenaasi abil. Kimbuümbrise rakkudes omakorda eemaldatakse malaadilt NADP-ME ensüümi abil CO<sub>2</sub>, viimane reageerib Calvini tsükli RuBP-ga Rubisco vahendusel. Tekib ka püruvaat, millest regenereeritakse PEP (Slack ja Hatch, 1967; Gowik ja Westhoff, 2011; Rao jt., 2016).



Joonis 2. Maisi lihtsustatud süsiniku sidumise skeem. Mesofüllirakud võtavad atmosfäärist CO<sub>2</sub> vastu mille karboanhüdraas (CA) teeb bikarbonaadiks (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Süsinik lisatakse fosfoenoolpüruvaadile (PEP) fosfoenoolpüruvaadi karboksülaasi (PEPC) abil. Saadud oksaalatsetaat (OAA) tehakse malaadi dehüdrogenaasi (MDH) abil malaadiks, viimane transporditakse kimbuümbrise rakku. Malaadilt saadakse NADP-ME abil CO<sub>2</sub>, mis siseneb Calvini tsükliks. Reaktsiooni tulemusena tekib ka püruvaat, millest regenereeritakse PEP. Originaaljoonis



Sel viisil on võimalik kontsentreerida süsihappegaas fotosünteesi tsentrisse ehk Rubisco ensüümi ümbrusesse, mis ühtlasi inhibeerib fotorespiratsiooni. Tänu sellele mehhanismile töötab kogu C<sub>4</sub>-taimede fotosüntees võrreldes C<sub>3</sub>-taimedega efektiivsemalt, mis omakorda võimaldab hoida õhulõhesid rohkem suletuna ja seeläbi vähendada veekadu süsiniku sidumisel (Gowik ja Westhoff, 2011).

#### **1.4. Maisi ja nisu globaalne olulisus**

Üle 50% taimedelt saadava toiduenergia annavad nisu, riis ja mais (IDRC). ÜRO andmetel on 2014. aasta seisuga koguseliselt maailmas enim kasvatatud teraviljaks mais 1,037 miljardi tonniga, teisel kohal riis 741 miljoni tonniga ja kolmandal kohal nisu 729 miljoni tonniga (FAOSTAT 2017). Need arvud annavad mõista, kui olulist rolli mängivad mais ja nisu nii inimeste toidulaual kui ka üldiselt maailmamajanduses.

Teraviljad pole ainult inimeste toidulauale mõeldud, see kehtib eriti maisi puhul. Näiteks Ameerika Ühendriigid kui suurimad maisikasvatajad kasutavad kogu maisitoodangust 27% etanooli tootmiseks, 50% loomasöödana ja 13% eksporditakse välismaale. Ülejäänud 10% kasutatakse inimtarbimiseks mõeldud toiduainete tegemiseks (Ranum jt., 2014). Samas on ka piirkondi, kus maisi kasutatakse otse toortoiduna. Selleks on näiteks Kesk- ja Lõuna-Aafrika, kus tarbib põhitoiduna maisi pool elanikkonnast ja kolmandik alatoidetud lastest eelistatult seda sööbki (CGIAR MAIZE 2016).

Kõige selle juures jätkab maailma rahvaarv kasvutrendi ning stabiliseerumist lähiajal oodata pole. Näiteks ÜRO andmetel ennustatakse 2050. aastaks maailma rahvastiku kasvu 9,6 miljardi elanikuni (Gerland jt., 2014). Kõige suuremat kasvu on oodata arengumaades, kusjuures 28 Aafrika riigi rahvaarvud kahekordistuvad (UN DESA 2015). Sellest lähtuvalt ennustatakse 2050. aastaks arengumaadesse ka kahekordset maisinõudlust, samas kui saagikus on kerkiva keskmise temperatuuri tõttu pigem vähenemas (Lobell jt., 2011; CGIAR MAIZE, 2016). Kuna nõudlus ja rahvaarv on tõusuteel, laskub enneolematu koormus põllumajandusele, sealhulgas maisi ja nisu kultiveerimisele ning tuleb kasvatada aina suuremaid koguseid, et rahvaarvuga sammu pidada (Foley jt., 2011). Kasvava teraviljanõudluse juures tuleb arvestada ka muutuva kliimaga. CO<sub>2</sub> kontsentratsioon atmosfääris tõuseb ning koos sellega ka maakera keskmine temperatuur (USDOC/NOAA). Prognooside kohaselt mõnedes regioonides põllumajanduse saagikus kasvab, samas teistel aladel väheneb (Nelson jt., 2009). Osalt põhjustab seda temperatuuri tõus, kuid teine suur faktor on vee kättesaadavus (Kang jt., 2009).

## 1.5. Osooni mõju taimedele

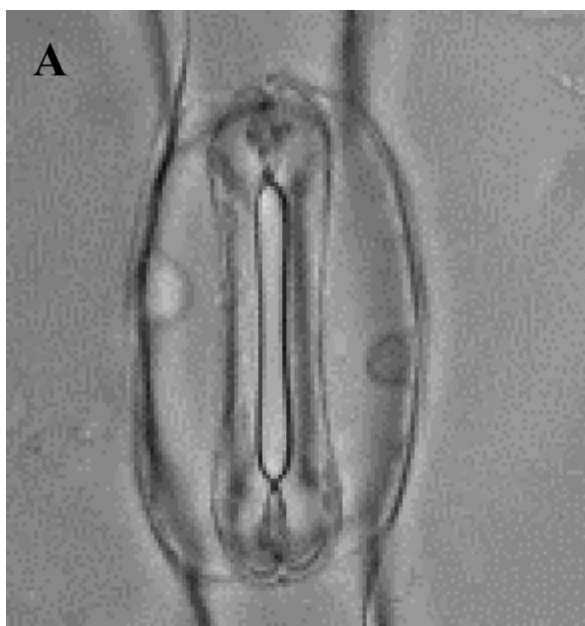
Looduses eksisteerib O<sub>3</sub> kihina stratosfääris, kus see püüab kinni suure osa päikeselt tulevast kahjulikust ultraviolet-kiirgusest, kuid atmosfääri madalamas kihis on osoon kahjulik (NOAA 2008). O<sub>3</sub> on sekundaarne saasteaine, mis tekib looduslikult kuid eelkõige tööstuse tagajärjel atmosfääri sattuvate lenduvate orgaaniliste ühendite, vingugaasi ja NO<sub>x</sub>-ide omavaheliste fotokeemiliste reaktsioonide tagajärjel (Chameides jt., 1999). Sellest lähtuvalt põhjustavad tööstusliku saaste kasv ja keskmise temperatuuri tõus pinnalähedase O<sub>3</sub> kontsentratsiooni tõusu (Fowler jt., 2008). Osoonisaaste mõjutab taimset produktsiooni ning selle tekitatud kahju põllumajandusele hinnatakse juba olevat mitu miljardit dollarit aastas (Van Dingenen jt., 2009).

Osoonisaaste on tõsine probleem üle kogu maakera, kuid eriti just Aasias, kus see põhjustab märgatavat saagikuse langust ning üldist kahju ökosüsteemidele (Feng jt., 2015). Samas mõõdetakse kõrgeid O<sub>3</sub> kontsentratsioone ka Euroopas ja Põhja-Ameerikas, seda tavaliselt suvel, kuumalainete ajal. O<sub>3</sub> tasemed on kõrged ka maapiirkondades, kaugel tööstustsoonidest (Ainsworth jt., 2012). Inimestel põhjustab O<sub>3</sub> hingamisteede tüsistusi, hinnanguliselt pool miljonit inimest sureb aastas osoonisaaste tõttu (Silva jt., 2013). Taimedel tekitab osoon oksüdatiivset stressi ning reaktiivseid hapniku ühendeid (ROS), mis omakorda vähendavad fotosünteesi ning läbi selle taimede kasvu ja produktsiooni (Ainsworth jt., 2012).

Osoon ning ROS-id oksüdeerivad rakukomponente, sealhulgas lipiide, valke ja nukleiinhappeid (Heath, 1987). Taimelehte pääseb osoon peamiselt õhulõhede kaudu (Kerstiens ja Lenzian, 1989), seetõttu kehtib üldine seos, et mida suurem on antud taimeliigi õhulõhede juhtivus, seda tundlikum on ta osoonile (Reich ja Amundson, 1985; Brosché jt., 2010; Ainsworth et al., 2012). Lehte sisenenud osooni degradeerumine rakuvaheruumis ehk apoplastis põhjustab eri ROS-ide, näiteks hüdroksüül- ja peroksüülradikaalid ning superoksiid, teket (Grimes jt., 1983; Mehlhorn jt., 1990; Runeckles ja Vaartnou, 1997). Mesofüllil apoplast on esmane kaitseliin osoonile (Luwe jt., 1993; Turcsányi et al., 2000). Osoneerimisel üle 150 ppb aktiveeruvad erinevad ROSidest, hormoonidest, Ca<sup>2+</sup> ja mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasidest (MAPK) lähtuvad signaalirajad (Baier jt., 2005). Akuutne osoneerimine peadib rakkude surmaga (Rao jt., 2002), krooniline osoneerimine madalas kontsentratsioonis, nii nagu see toimub looduses, langetab fotosünteesi ning kiirendab taime vananemist (Pell jt., 1997). Elusorganismide, sh. taimede, elutegevuse käigus tekkivaid ROS-e neutraliseeritakse antioksidantidega (Birben jt., 2012). Askorbaat on peamine vees lahustuv antioksidant apoplastis, mis kaitseb taimi ROS-ide ja osooni eest (Luwe, 1996).

## 1.6. Õhulõhed

Õhulõhed on olemas kõigil soontaimedel ning ka mõningatel primitiivsematel taimedel, näiteks sammaldel. Selle moodustavad kaks sulgrakku ning nende vahel olev pilu. Kõrreliste, sh. maisi ja nisu, sulgrakud on hantlikujulised (Joonis 3), seevastu tüüpilise mudeltaime *A. thaliana* sulgrakud on neeru-kujulised (Taiz ja Zeiger, 2003). Kõrreliste sulgrakke ümbritsevad kummaltki poolt veel spetsiaalsed kaasrakud, mis aitavad kaasa õhulõhede sulgumisele ja avanemisele (Meidner ja Mansfield, 1968; Büchsenschütz jt., 2005). Õhulõhede abil saavad taimed atmosfäärist süsihappegaasi kätte, kuid kaotavad samas vett (Cowan ja Troughton, 1971).



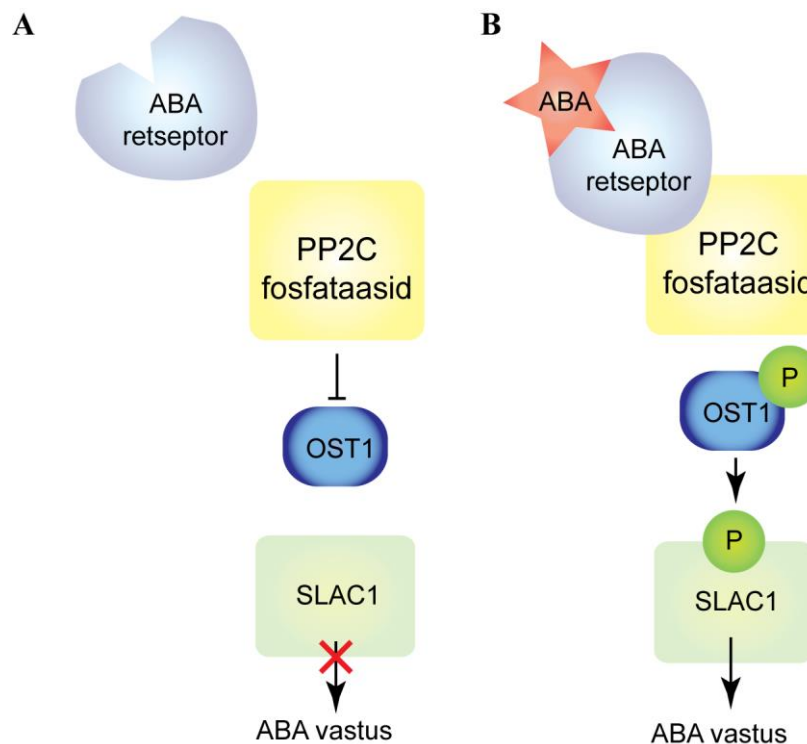
Joonis 3. Õhulõhe ja hantlikujulised sulgrakud. Boomingplants, 8. juuni 2014, Wordpress. Originaalpilti on muudetud

### 1.7. Õhulõhede regulatsioon abstsiihappe, CO<sub>2</sub> ja O<sub>3</sub> mõjul.

Õhulõhede avanemine toimub sulgrakkude turgori suurenemise tõttu (Taiz ja Zeiger, 2003). See saavutatakse H<sup>+</sup> ionide väljapumpamisega tsütoplasmast H<sup>+</sup>-ATPaasi poolt, mis omakorda membraani hüperpolarisatsiooni tõttu põhjustab K<sup>+</sup>-ioonide sissevoolu läbi K<sup>+</sup>-selektiivseteioonkanalite. Koos K<sup>+</sup>-ioonidega liiguvad rakku ka anioonid ning seejärel läbi akvaporinide ka vesi ning rakusisene rõhk tõuseb (Assmann ja Shimazaki, 1999). Sulgrakkude turgori suurenemist indutseerivad madal lehesisene CO<sub>2</sub>, valgus (sh sinine valgus) ning kõrge õhuniiskuse (Lange jt., 1971; Assmann ja Shimazaki, 1999).

Kuigi mitmed erinevad fütohormoonid (jasmonaat, etüleen) osalevad õhulõhede regulatsioonis, on sulgumine peamiselt seotud abstsiihappega (ABA; Cutler jt., 2010; Daszkowska-Golec ja Szarejko, 2013). Sulgumisel inhibeeritakse H<sup>+</sup>-ATPaas ning läbi Ca<sup>2+</sup>-ioonkanalite aktivatsiooni suurendab ABA rakusisest Ca<sup>2+</sup>-ioonide kontsentratsiooni (Schroeder ja Hagiwara, 1990). Seejärel aktiveeruvad omakorda S- ja R-tüüpi anioonkanalid, mis transpordivad malaat<sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup> ning NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ioone rakust välja (Roelfsema jt., 2004). Sulgraku membraan depolariseerub ja toimub K<sup>+</sup>-ioonide transport rakuvälisesse ruumi. Koos ionidega liigub sulgrakust välja ka vesi ning see väljendub õhulõhe sulgumisena (Taiz ja Zeiger, 2003). Kõrrelistel toimub K<sup>+</sup>-ioonide vahetus sulgrakkude ja kaasrakkude vahel, mis võimaldab kiiremaid õhulõhede reaktsioone (Büchsen-schütz jt., 2005; Merilo jt., 2014). *Arabidopsis*il on tuvastatud S-tüüpi kanalite geenidest SLAC1 ning SLAH3 (Vahisalu jt., 2008; Geiger jt., 2011) ning R-tüüpi kanalite geenidest QUAC1 (Meyer jt., 2010).

On näidatud, et õhulõhede sulgumine mitmete stiimulite, s.h kõrge [CO<sub>2</sub>] ja ABA toimel, teostub suures osas just SLAC1 anioonkanali vahendusel (Vahisalu jt., 2008; Kollist jt., 2011). ABA mõjutab SLAC1 kanalit läbi OST1 kinaasi aktivatsiooni (Joonis 4). OST1 kinaas on ABA puudumisel inaktiivne PP2C fosfataaside aktiivsuse tõttu. ABA juuresolekul moodustavad ABA PYR/PYL/RCAR retseptorid koos ABA ning PP2C fosfataasidega kompleksi, milles fosfataasid inaktiveeritakse. OST1 autofosforüleerub ja saab seejärel aktiveerivalt fosforüleerida SLAC1 kanali, mis võimaldab anioonide väljumise sulgrakkudest (Kollist jt., 2011). Maisil on üheks OST1 geeni homoloogiks ZmOST1 (Vilela jt., 2013) ning nisul PKABA1, mille ekspressioon, erinevalt Arabidopsise OST1-st, tõuseb ABA ja veepuuduse mõjul (Assmann, 2003).



Joonis 4. Sulgrakkude ABA signalisatsiooni lihtsustatud skeem (Hanna Hõrak, 2017). **A.** ABA puudumisel on PP2C fosfataasid aktiivsed ning OST1 defosforüleeritud ehk inaktiivne. Seetõttu on ka SLAC1 inaktiivne ja õhulõhe avatud. **B.** ABA seondumisel PYR/PYL/RCAR retseptoriga inaktiveeritakse PP2C. OST1 autofosforüleerub ning fosforüleerib SLAC1-kanali. Õhulõhed sulguvad. Originaaljoonist on muudetud.

Õhulõhed avanevad madala lehesisese  $[CO_2]$  juures ning sulguvad selle tõustes (Zeiger jt., 1987; Mott, 1988). Kuigi  $CO_2$  signalisatsiooni molekulaarne rada nii õhulõhede avanemisel kui sulgumisel sisaldab veel hulga küsimärke, on *Arabidopsis*il leitud, et sulgumisel omavad olulist rolli SLAC1, tema aktivaator OST1 kinaas ning PYR/RCAR retseptorkompleks (Xue jt., 2011; Merilo jt., 2013). Kõrgenenud  $[CO_2]$  tase põhjustab bikarbonaadi kontsentratsiooni tõusu rakus, viimase teket  $CO_2$ -st vahendavad karboanhüdraasid (Hu jt., 2010). Kõrgem  $[HCO_3^-]$  rakus omakorda tõstab S-tüüpi anioonkanalite tundlikust  $Ca^{2+}$ -ioonidele (Xue jt., 2011). Väga oluline õhulõhede reaktsioonil  $CO_2$ -le on ka HT1 kinaas, mis toimib  $CO_2$ -signaalraja negatiivse regulaatorina (Hashimoto jt., 2006). Samas mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasid MPK4 ja MPK12 inaktiveerivad kõrge  $CO_2$  signaali korral HT1 kinaasi, võimaldades õhulõhede sulgumist aktiivse SLAC1 vahendusel (Hõrak jt., 2016). Paljasseemnetaimedel ja sõnajalgadel on reageerimine  $CO_2$  kontsentratsiooni muutusele läbi  $Ca^{2+}$  signalisatsiooni minimaalne või puudulik, seetõttu on nende õhulõhede  $CO_2$ -reaktsioon vähem ulatuslik ja aeglane, võrreldes katteseemnetaimede (müürlook, nisu, mais) omaga (Brodribb ja McAdam, 2013).

Osooni põhjustatud õhulõhede sulgumise põhjuseks on pakutud lehesisese süsihappegaasi kontsentratsiooni tõusu (Ainsworth jt., 2012) ning ROS-ide poolt indutseeritud mitteensümaatilist ABA teket lehes (McAdam jt., 2017). Sarnaselt õhulõhede reaktsioonidele

[CO<sub>2</sub>] muutustele põhjustavad rikutud SLAC1 ja OST1 valgud õhulõhede O<sub>3</sub>-reaktsiooni vähenemise või puudumise (Vahisalu jt., 2008; Xue jt., 2011; Merilo jt., 2013).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Teraviljade fotosünteesi ja õhulõhede regulatsiooni on uuritud suhteliselt vähe arvestades nende olulisust inimkonnale. Mudeltaimede, peamiselt *Arabidopsis thaliana* kohta on andmeid hulgaliselt rohkem. Veel vähem on selliseid uuringuid, mis võrdlevad eri teravilju. Selle töö eesmärgiks on uurida ning võrrelda,

- kuidas erinevad maisi (*Zea mays*) ja nisu (*Triticum aestivum*) õhulõhede juhtivus (gs), fotosünteesi kiirus (Anet) ning hetkeline veekasutuse efektiivsus (WUE) normaaltingimustes;
- kuidas mõjutavad CO<sub>2</sub> kontsentratsioon ning osoon gs ja Anet väärtusi maisil ja nisul;
- kuidas muutub nisu ja maisi õhulõhede juhtivus ABA toimetel

### 2.2. Taimede kasvatamine

Katsetes kasvatati kultuurmaisi (*Zea mays* L., sort Vivacity) ja –nisu (*Triticum aestivum*, sort KWS Scirocco). Esmalt pandi maisi ja nisu seemned idanema märja salvrätiku vahele Petri tassidesse kaheks kuni kolmeks päevaks ning seejärel külvati idandid 1L pottidesse, igasse potti kaks taime. Istutamisel kasutatud kasvusubstraat koosnes turbast, vermikuliidist ning veest (4:2:3). Taimi kasvatati kasvukambrites, mille valgusrežiim oli 12 tundi valgust/12 tundi pimedust; temperatuur vastavalt 23°C/18°C. Fotosünteesiliselt aktiivne kiirgus (PPFD) taimede kõrgusel oli keskmiselt 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ning suhteline õhuniiskus 70%. Taimi kasteti regulaarselt. Gaasivahetuskatseid tehti taimedega, mis olid kahe kuni kolme lehe staadiumis, taimede vanus oli siis 9-20 päeva, kusjuures nisutaimede keskmiseks vanuseks katsete ajal oli 13,5 päeva ning maisil 12,8 päeva, sest maisitaimed kasvasid kiiremini.

### 2.3. Aparatuur

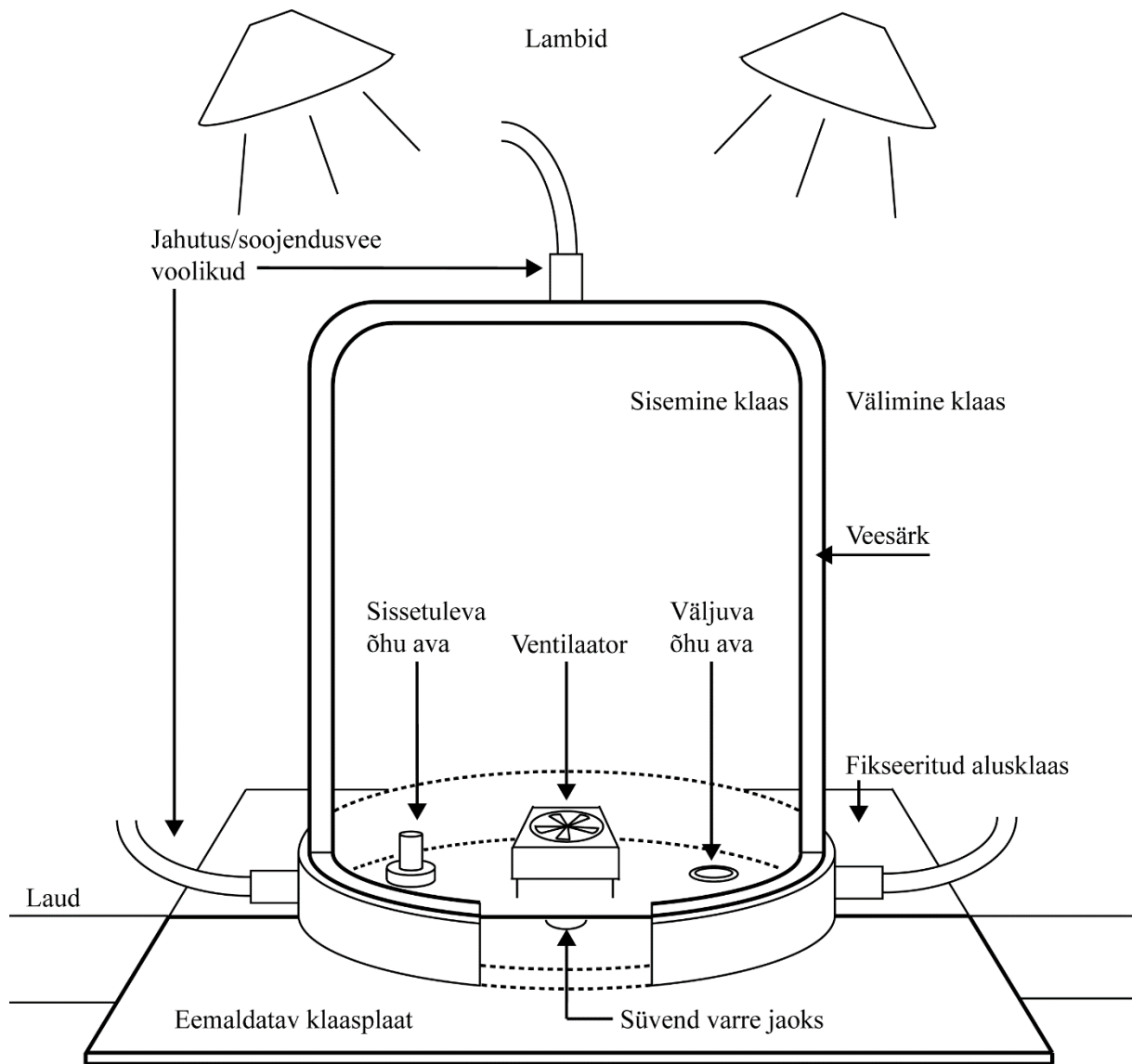
Taimede gaasivahetust mõõdeti eritellimusel tehtud 4-kambrilise termostateeritud katseseadmega, mis võimaldab paralleelselt mõõta nelja taimet (Joonis 5).



Joonis 5. Termostateeritud nelja-kambriline aparatuur gaasivahetuse mõõtmiseks. Pildistanud Egon Meigas.

Kambri moodustab kahekordse seinaga klaaskuppel (Joonis 6), mille vahel on termostaadi abil muudetava temperatuuriga veesein. Kambri sisemise seina diameeter on 10,6 cm ja kõrgus 15,6 cm – võimaldades mõõta suuremaid ja kõrgemaid taimi, kui seda on mudeltaim *Arabidopsis*. Kuppel istub kahe klaasplaadi peale, millest üks on eemaldatav ning mille servas on süvendus, kust saab taime varre läbi panna. Teise plaadi küljes on õhu sisse- ja väljavoolu avad, temperatuuri sensor ja väike ventilaator, mis tagab ühtlase õhu jaotuse mõõtekambris. Vörse ja klaasi vaheliste tühikute tihendamiseks kasutati plastiliini. Kambrid olid hermeetiliselt suletud ning kerge ülerõhu all, et vältida välisõhu ligipääsu kambritesse. Õhuvoolu kiirus kambris oli  $2,5 \text{ l min}^{-1}$ . Taimede valgustamiseks oli iga kambri kohal neli 50W halogeenpirni, mis tagasid taime kõrgusel maksimaalse PPFD väärtuse  $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Hõrak jt., 2017).





Joonis 6. Nelja-kambrilise gaasivahetusaparatuuri ühe kambri illustratsioon. Originaaljoonis.

Mõõtekambris mõõdeti otseselt õhutemperatuuri ning kambrisse sisse- ja väljamineva õhu  $\text{CO}_2$  ja veeauru kontsentratsioone.  $\text{CO}_2$  ja veeauru sisaldust mõõdeti infrapuna gaasianalüsaatoriga (Li-7000, Li-Cor, Nebraska, USA) ning nende gaaside kontsentratsioonide vahe kaudu sai arvutada kambris olnud taime transpiratsiooni ja fotosünteesi kiiruse spetsiaalse programmiga. Edasi arvutas programm transpiratsioonist lähtudes õhulõhede juhtivuse, arvestades lehetemperatuuri. Osooni kontsentratsiooni mõõdeti UV osooni analüsaatoriga (EC 9810, Ecotech, Austraalia).

## 2.4. Katsete läbiviimine

Taimed paigutati mõõtekambritesse ning jäeti 1-2 tunniks stabiliseeruma, kuni õhulõhede juhtivus enam ei kõikunud. Stabiliseerumise ajal oli temperatuur kambris 24°C, CO<sub>2</sub> kontsentratsioon 400 ppm, õhuniiskus 65-75%.

CO<sub>2</sub> katse puhul jälgiti nii õhulõhede avanemist madalas [CO<sub>2</sub>] kui ka sulgumist kõrge [CO<sub>2</sub>] puhul. Pärast õhulõhede juhtivuse stabiliseerumist langetati kambrites [CO<sub>2</sub>] normaaltasemelt (ehk c.a 400 ppm) 100 ppm-i peale kaheks tunniks, siis taastati normaalne kontsentratsioon (400 ppm) kaheks tunniks ning seejärel tõsteti kambrites CO<sub>2</sub> 800 ppm-i peale taaskord kaheks tunniks. Tegemist oli pika katsega, mis kestis koos stabiliseerumisega ligi 8 tundi. Katse lõppedes fotografeeriti mõõtekambris olnud lehed ning määrati nende pindala ImageJ programmiga (versioon 1.37). Katset tehti mõlemal liigil 8 taimega.

Osoneerimisel tõsteti stabilisatsiooniperioodi lõppedes kambrite O<sub>3</sub> kontsentratsiooni nii, et kambrist väljuva õhu O<sub>3</sub> kontsentratsioon oli keskmiselt 400 ppb ning seda hoiti tund aega. Katse lõpus kambris olnud lehed pildistati. Katset tehti 8 maisitaimega ja 7 nisutaimega.

Abstsiišappe (ABA) katses pritsiti taimi 10 µM ABA lahusega, milles sisaldus ka 0,05% etanooli ning 0,012% detergenti Silwet L-77. Pritsimisel eemaldati taimelt kuni 10 sekundiks kambrikaas, tehti ABA lahusega 4-5 pihustust ning seejärel asetati kaas tagasi ja jätkati mõõtmist 60 minuti jooksul. Igas abstsiišappe katses pritsiti neljast ühte taime kontroll-lahusega. Kontroll-lahuses sisaldasid ainult etanool (0,05%) ja Silwet (0,012%), kuna ABA oli algselt lahustatud etanoolis. Katse lõpus taimed lõigati ja pildistati. ABA pritsimine tehti mõlemal liigil 6 taimega, kontrollpritsimine mõlemal liigil kahe taimega.

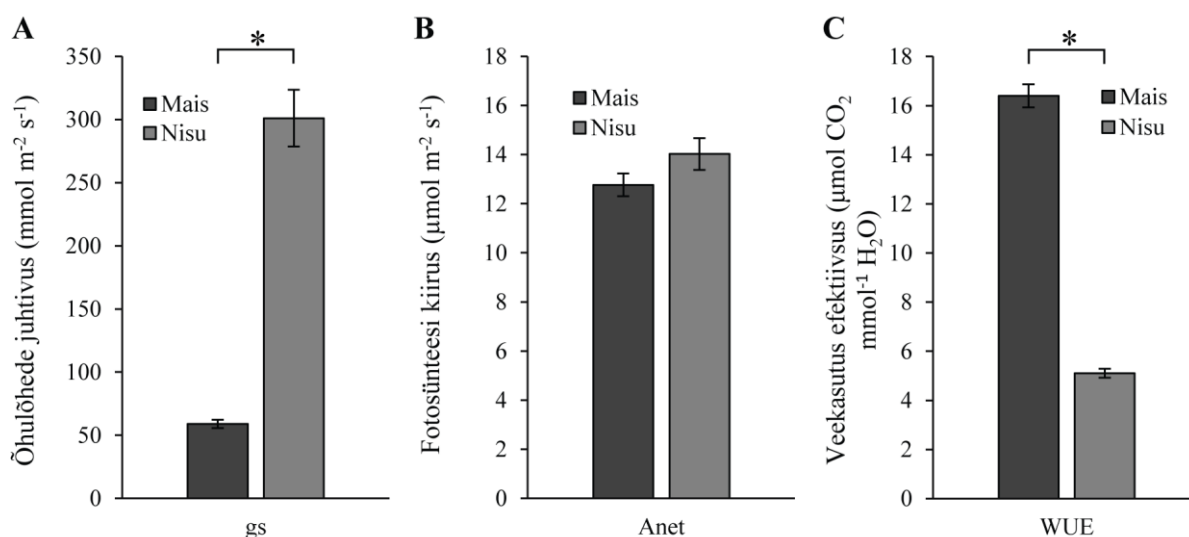
## 2.5. Andmeanalüüs

Andmete analüüsil kasutati spetsiaalset programmi, mis lähtudes kambrisse sisenevate ja väljuvate CO<sub>2</sub> ja veeauru kontsentratsioonide erinevustest, õhuvoolukiirusest, kambri ja lehetemperatuurist ning lehepindalast arvutab transpiratsiooni, Anet ning gs väärtused. Hetkeline veekasutuse efektiivsus, WUE, arvutati fotosünteesi ja transpiratsiooni suhtena. Edasi leiti mõlemale liigile õhulõhede juhtivuse ja fotosünteesi keskmised väärtused enne stiimulite rakendamist ning iseloomustati õhulõhede reaktsioone stiimulitele. Osooni katses arvutati ka poolestusaeg. Poolestusaeg saadi osoneerimise käigus registreeritud õhulõhede vastuste skaleerimisel vahemikku 0 kuni 100% ning arvutades välja ajahetke, mil õhulõhed olid 50% ulatuses sulgunud. Statistiline andmeanalüüs tehti programmiga Statistica (versioon 7.1, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Selleks, et hinnata liigi mõju gaasivahetustunnustele, kasutati

dispersioonanalüüsi (*Analysis of variance*) ning *post hoc* testina Tukey HSD testi. Veel kasutati meetodina korduvmõõtmistega ANOVAt (*Repeated measures ANOVA*), et hinnata gaasivahetustunnuste väärtuste erinevusi enne ja pärast töötlust.

## 2.6. Tulemused

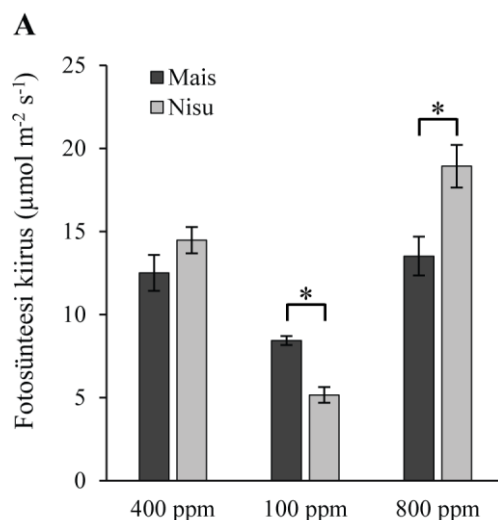
Õhulõhede juhtivus (gs) iseloomustab kiirust, millega vesi lehest aurub ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Anet näitab  $\text{CO}_2$  omastamise kiirust ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Veekasutus efektiivsus (WUE) on suhe Anet ja transpiratsiooni vahel ( $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$ ). Stabiliseerimisperioodi lõpus leiti mõlema liigi gs, Anet ja WUE väärtused normaaltingimustel. Joonisel 7 on näha, et nisu keskmine juhtivus oli keskmiselt 6 korda suurem võrreldes maisiga, sellest tulenevalt tema WUE oli üle 3 korra väiksem. Samas Anet oli nisul ja maisil statistiliselt sarnane.



Joonis 7. Joonisel on näidatud maisi ja nisu gs (A), Anet (B) ja WUE (C) keskmised väärtused normaaltingimustel koos vearistidega. Statistiliselt olulised erinevused liikide vahel ( $p < 0,05$ ) on märgitud tärniga (\*), mis saadi kasutades ANOVAt ja *post hoc* testina Tukey HSD testi.

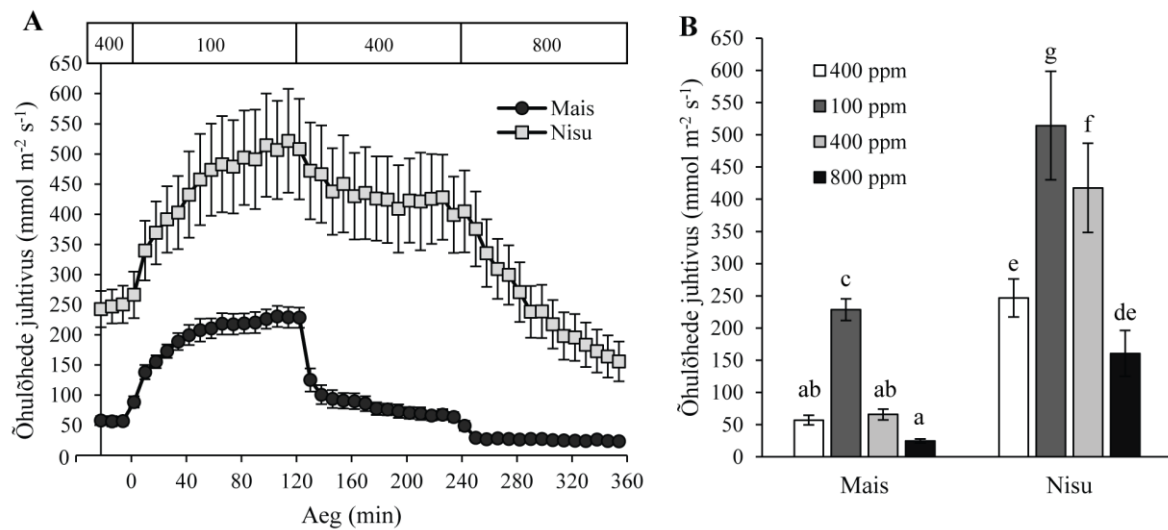
### 2.6.1. Õhulõhede ja fotosünteesi reaktsioon süsihappegaasile

Taimede Anet mõõdeti normaalse, madala ja kõrge  $[\text{CO}_2]$  juures. Madala  $[\text{CO}_2]$  (100 ppm) puhul langes nisul Anet oluliselt rohkem kui maisil, kõrges  $[\text{CO}_2]$ -s (800 ppm) aga tõusis rohkem kui maisil (Joonis 8). Seega varieerus nisu fotosüntees  $\text{CO}_2$ -katses 3,7 korda, kuid maisil ainult 1,6 korda. See illustreerib  $\text{C}_4$ -fotosünteesi suhteliselt suurt sõltumatust  $[\text{CO}_2]$ -st, mis on tingitud kahekordsest karboksüleerimisest lehe sees.



Joonis 8. Anet ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) maisil ja nisul erinevatel süsihappegaasi kontsentratsioonidel (ppm) koos vearistidega. Statistiliselt olulised ( $p < 0,05$ ) erinevused liikide vahel on märgitud tärniga (\*) ning saadi kasutades ANOVAt ja *post hoc* testina Tukey HSD testi.

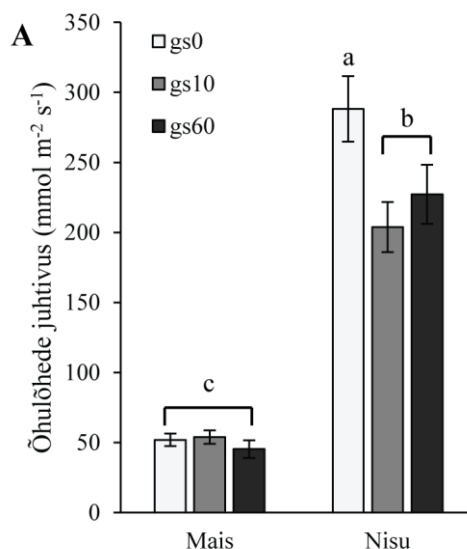
Nii nisu kui maisi  $g_s$  tõusis  $[\text{CO}_2]$  langedes ning vastupidi, langes  $[\text{CO}_2]$  tõustes (Joonis 9A). Erinevuseks oli, et maisi õhulõhed olid tundlikumad süsihappegaasi vähenemise suhtes, avanedes kordades rohkem, võrreldes esialgse  $g_s$  väärtusega (Joonis 9B). Normaalse  $\text{CO}_2$  kontsentratsiooni taastudes sulgusid maisi õhulõhed esialgsele tasemele, kuid nisul mitte. Nisul toimus suurem  $g_s$  langus  $[\text{CO}_2]$  tõustes 400 ppm pealt 800 ppm-ni. Kokkuvõttes võib öelda, et nisutaimede juhtivus muutus suuremas absoluutskaalas võrreldes maisiga ning mais suutis oma õhulõhesid palju rohkem suletuna hoida kogu katse vältel.



Joonis 9. Õhulõhede juhtivused maisil ja nisul erinevatel süsihappegaasi kontsentratsioonidel. **A.** Mõlema liigi õhulõhede juhtivus ajas. Ajapunktis 0 langetati CO<sub>2</sub> kontsentratsioon 100 ppm peale; 120 minuti peal tõsteti taas 400 peale; 240 minuti peal tõsteti 800 peale. Näidatud on õhulõhede keskmine juhtivus koos vearistidega. n=8. **B.** Keskmised gs lõppväärtused iga CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni juures koos vearistidega. Olulised erinevused ( $p < 0,05$ ) juhtivustes liigi sees on märgitud erinevate tähtedega (korduvmõõtmisega ANOVA ja Tukey test).

### 2.6.2. Õhulõhede reaktsioon abstsiiishappele

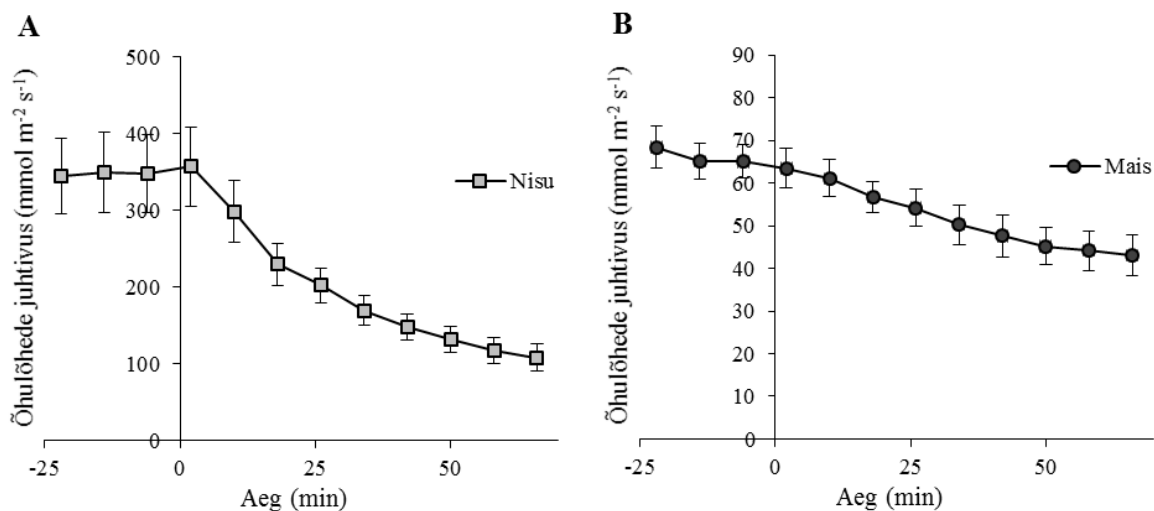
Analüüsiiti maisi ja nisu õhulõhede vastust 10  $\mu\text{M}$  ABA lahusega pritsimisele. Selgus, et nisutaimed on tundlikud ABAGA pritsimise suhtes: nende gs oli langenud 10 minutit pärast pritsimist keskmiselt 30%, kusjuures katse lõpuks, st 60 minutit peale ABAGA pritsimist, ei olnud märgatavat juhtivuse taastumist toimunud (Joonis 10). Maisi pritsimisel ABA-ga gs väärtuse statistiliselt olulist vähenemist ei leitud ning tundub, et mais ei reageeri üldse sellisele ABA kontsentratsioonile. Kontroll-lahusega pritsimisele kummalgi liigil olulist juhtivuse muutust ei täheldatud (andmeid pole esitatud).



Joonis 10. Maisi ja nisu õhulõhede juhtivused enne ja pärast ABA (10  $\mu\text{M}$ ) lahusega töötlemist. gs0 – keskmine juhtivus enne töötlemist; gs10 – keskmine juhtivus 10 minutit pärast töötlemist. gs60 – keskmine juhtivus 60 minutit pärast töötlemist. Mõlemal liigil  $n=6$ . Statistiliselt olulised erinevused liigi sees on märgitud erinevate tähetedega (korduvmõõtmistega ANOVA ja Tukey test).

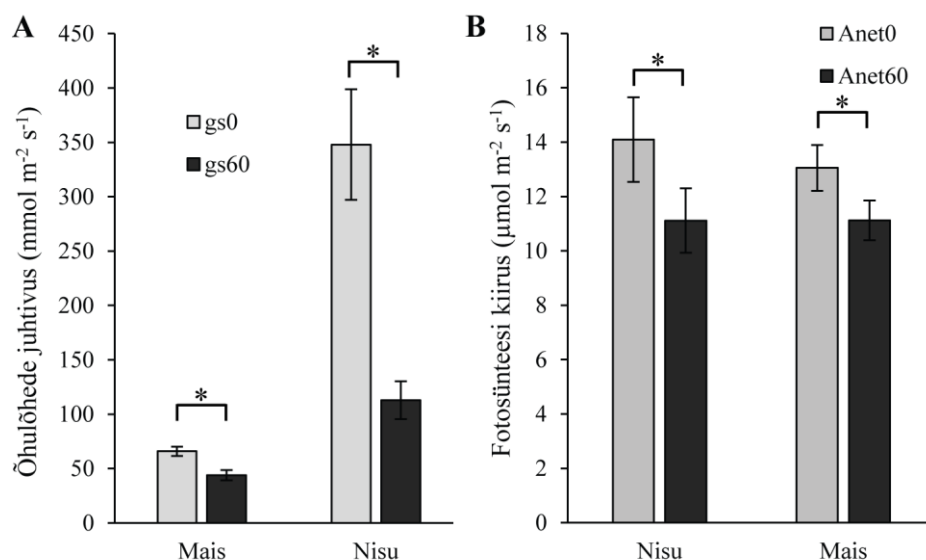
### 2.6.3. Õhulõhede ja fotosünteesi reaktsioon osoonile

Osoneerimisel toimuvat õhulõhede juhtivuse langust ajas illustreerib Joonis 11. Nisu juhtivus langes osoneerimisel katse lõpuks 67%, kuid maisil vaid 33%.



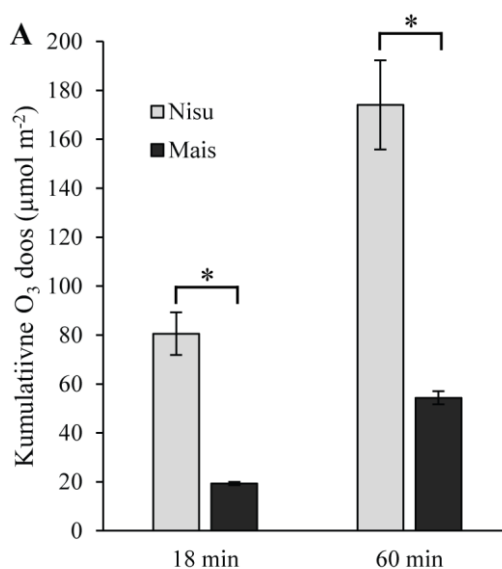
Joonis 11. Nisu (A, n=7) ja maisi (B, n=8) õhulõhede juhtivuse ajaline käik osoneerimisel. Ajapunktis 0 tõsteti osooni kontsentratsioon 400 ppb peale 60 minutiks.

Ehkki juhtivuse langus polnud maisil nii märkimisväärne nagu nisul, oli see siiski statistiliselt oluline (Joonis 12A). Mõlemal liigil langes Anet osooni mõjul sarnaselt ning statistiliselt oluliselt (Joonis 12B). Nisutaimedel oli O<sub>3</sub>-reaktsiooni keskmine poolestusaeg 20,4 minutit ning maisil 27,31 minutit, need väärtused olid erinevad P<0,1 puhul. Seega võib öelda, et maisi õhulõhded sulgusid osooni mõjul veidi aeglasemalt.



Joonis 12. Maisi (n=8) ja nisu (n=7) gs ja Anet väärtuste muutumine osooni mõjul. **A.** Maisi ja nisu gs enne osoneerimist (gs0) ja 60 minutit pärast osoneerimise algust (gs60). **B.** Maisi ja nisu fotosünteesi kiirused enne osoneerimist (Anet0) ja 60 minutit pärast osoneerimise algust (Anet60); keskmised koos vearistidega. Statistiliselt olulised erinevused liigi sees ( $p < 0,05$ ) on märgitud tärniga (korduvmõõtmistega ANOVA ja Tukey test).

Nisul oli õhulõhede kaudu omastatud kumulatiivne  $\text{O}_3$ -doos nii 18 minutit pärast osoneerimist kui ka katse lõpus kõrgem kui maisil (Joonis 13), s.t nisu omastas rohkem osooni kogu katse vältel.



Joonis 13. Maisi (n=8) ja nisu (n=7) kumulatiivne  $\text{O}_3$ -doos 18 minutit ja 60 minutit pärast osoneerimise algust. Keskmised koos vearistidega. Statistiliselt olulised erinevused liikide vahel ( $p < 0,05$ ) märgitud tärniga (korduvmõõtmistega ANOVA ja Tukey test).



## 2.7. Arutelu

Kuna mais kuulub C<sub>4</sub>-taimede ja nisu C<sub>3</sub>-taimede hulka, võis eeldada fundamentaalseid erinevusi nende taimede gaasivahetuses normaalingimustel. Maisi õhulõhed olid kõigis olukordades rohkem suletud, tagades kõrgema WUE. Selle põhjuseks on C<sub>4</sub>-tüüpi fotosünteesi eripära, mis võimaldab CO<sub>2</sub> kontsentreerumist Calvini tsükli toimumiskohta, väiksemat gs väärtust ning tagab lõppkokkuvõttes edukama funktsioneerimise veevaestes olukordades (Sage ja Monson, 1999; Gowik ja Westhoff, 2011). Nisu õhulõhede juhtivus oli maisi omaga võrreldes 6x kõrgem (Joonis 7A), sest C<sub>3</sub>-fotosüntees nõuab suuremat õhulõhede avatust, tagamaks võimalikult soodsat fotosünteesi suhet fotorespiratsiooni (Sage ja Monson, 1999)

On näidatud, et võrreldes C<sub>3</sub>-taimedega on C<sub>4</sub>-taimedel kõrgem Anet väärtus tugeva valguse ja troopiliste tingimuste juures (Sage ja Monson, 1999). Meie katsetes olid nisu ja maisi fotosünteesid normaalingimustel statistiliselt sarnased (Joonis 7B). Võimalik, et kui mõõtekambrite temperatuur oleks olnud kõrgem kui valitud 24°C, oleks maisi fotosünteesiline eelis paremini välja tulnud. Madalamatel temperatuuridel on fotosünteesi efektiivsus C<sub>3</sub>-taimedel parem kui C<sub>4</sub>-taimedel, temperatuuri vahemikus 25°C-30°C aga ületab C<sub>4</sub>-fotosünteesi efektiivsus C<sub>3</sub> oma, kuna temperatuuri tõustes hakkab O<sub>2</sub> järjest edukamalt süsihappegaasiga Rubiscoga seondumisel konkureerima (Hatch, 1992; Sage ja Monson, 1999). See on ka põhjus, miks Eesti looduses C<sub>4</sub> taimi peaaegu pole (va *Suaeda maritima*, rand-soodahein) – siin on liiga jahe.

### 2.7.1. Süsihappegaasi katse

Alates 1959-ndast aastast on registreeritud [CO<sub>2</sub>] tõus 316 ppm pealt praeguse 405,75 ppm-ni, kusjuures viimase viie aastaga on CO<sub>2</sub> kontsentratsioon tõusnud keskeltläbi 10 ppm (Keeling jt., 1976; USDOC/NOAA 2017). Arvestades, et viimase 800000 aasta jooksul on CO<sub>2</sub> tase kõikunud vahemikus 170-300 ppm ning hetkel tõuseb 3 ppm aastas (Petit jt., 1999; Lüthi jt., 2008; USDOC/NOAA 2017), on katses kasutatud CO<sub>2</sub> kontsentratsioonid (100 ppm ja 800 ppm) küll ekstreemsed, aga siiski põhjendatud. Samas polnudki CO<sub>2</sub>-katse eesmärk uurida nisu ja maisi gs ning Anet reaktsioone minevikus või tulevikus esinenud/esinevatele CO<sub>2</sub> kontsentratsioonidele, vaid pigem võrrelda nende teraviljade oluliste füsioloogiliste tunnuste reageerimist muutusele CO<sub>2</sub> kontsentratsioonis. Kasutatud [CO<sub>2</sub>] olidki sellised, et erinevused võimalikult paremini esile tuleksid.

C<sub>4</sub>-taimede lehtedes toimuv kahekordne CO<sub>2</sub> fikseerimine tagas selle, et maisi Anet oli [CO<sub>2</sub>] suhtes oluliselt tundetum võrreldes nisuga. Võrreldes katse-eelsete arvudega tõusis

maisil Anet kõrges [CO<sub>2</sub>]-s vaid 7% nisu 23% kõrval ning langes madalas [CO<sub>2</sub>]-s maisil vaid 32%, võrreldes nisu 64%-ga (Joonis 8).

Õhulõhede sulgumist või avanemist CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni muutudes täheldati juba eelmise sajandi esimesel poolel (Heath, 1948; Zeiger jt., 1987). Varem on näidatud, et C<sub>3</sub>- ja C<sub>4</sub>-taimede õhulõhed on sama tundlikud CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni muutusele (Morison ja Gifford, 1983). Meie katsed osaliselt kinnitasid seda – nii nisu kui mais avasid ja sulgesid õhulõhesid [CO<sub>2</sub>] muutudes. Samas olid maisitaimed tundlikumad [CO<sub>2</sub>] languse suhtes, mil maisi gs tõusis 4x võrreldes nisu 2x tõusuga, kuid nisutaimed olid veidi tundlikumad [CO<sub>2</sub>] tõusu suhtes (Joonis 9B).

### 2.7.2. Abstsiihappe katse

ABA on taimehormoon, mis reguleerib taimedes mitmeid protsesse, sealhulgas stressivastust (Swamy ja Smith, 1999; Cutler jt., 2010). Põua ja kõrge soolsuse korral on vee kättesaadavus häiritud ning see põhjustab rakkudes turgorrõhu langust. Sellele vastuseks suureneb ABA süntees, mis tagab ökonoomsema veekasutuse taimedes (Jia jt., 2002; Finkelstein, 2013). ABA roll taimede veemajanduses on tihedalt seotud õhulõhede sulgumisega (Kriedemann jt., 1972).

Varem on näidatud, et taimed reageerivad kunstlikule ABA lisamisele õhulõhede sulgemisega (Pantin jt., 2013; Kollist jt., 2014). Küll aga varieerub reaktsiooni kiirus, näiteks oal (*Phaseolus vulgaris* L.) on ABA-toimeline õhulõhede sulgumine registreeritav 8-9 minutit peale töötlust, maisil vastavalt (*Zea mays*) 3 minutit ja roosil (*Rosa* spp) 32 minutit (Kriedemann jt., 1972). Minu katsetes oli 10 µM ABA-ga pritsimise efekt ilmne ainult nisul – tema gs oli nii 10 kui 60 minutit peale pritsimist oluliselt langenud, võrreldes pritsimiseelsete väärtustega (Joonis 10). Õhulõhede ABA-vastuse puudumine maisil on üllatav. Kriedemann jt (1972) näitasid, et kuigi maisil oli õhulõhede ABA-toimeline sulgumine registreeritav juba kolmandal minutil, kestis kogu sulgumiseperiood 105 minutit, mis oli palju pikem kui näiteks oal. Lisaks sellele täheldati, et mais nõudis õhulõhede sulgumiseks suuremat ABA kontsentratsiooni võrreldes näiteks oa või roosiga. See põhjendaks, miks mais ei reageerinud minu katsetes kasutatud ABA kontsentratsioonile ja miks väikest, ehkki statistiliselt mitteolulist juhtivuse langust võis näha alles 60 minutit peale pritsimist (Joonis 10).

Peamiseks viljasaake vähendavaks abiootiliseks faktoriks peetakse veedefitsiiti (Lipiec jt., 2013). Minu katsed toovad välja kaks aspekti nisu ja maisi võimalikust põuataluvusest. Ühelt poolt on maisi gs madalam ning WUE oluliselt kõrgem võrreldes nisuga, see peaks

tagama maisile suurema põuatolerantsuse. Samas ei reageerinud maisi õhulõhed minu katses üldse stressihormoon ABAle. On näidatud, et kui normaaltingimustel on maisi (*Zea mays* L.) lehesisene ABA kontsentratsioon kõrgem võrreldes näiteks põuakindla sorgo sordi (*cultivar* M35-1) ABA kontsentratsiooniga, siis veedefitsiidi juures tõuseb maisi ABA tase kordades vähem kui sorgol (Larqu -Saavedra ja Wain, 1976). Seega on võimalik, et maisi õhulõhed opereerivad teistsugustes ABA kontsentratsioonides kui need, mida mina oma katses kasutasin. Selle selgitamiseks tuleks ABA-katset korrata, kasutades kõrgemaid kontsentratsioone.

Tehes järeldusi veedefitsiidi mõjust terasaagile tuleb arvesse võtta, et kuigi õhulõhede juhtivuse langus on esmane vastus põuale, mõjutavad pikalt kestva põua juures põldude saake mitmed erinevad faktorid: fotosünteesi efektiivsuse langus läbi Rubisco aktiivsuse ja RuBP regeneratsiooni languse tõttu; osmootsete kohastumiste edukus (OA); juurte sügavus (LaRosa jt., 1987; Ripley jt., 2007; Daryanto jt., 2016). LaRosa jt (1987) näitasid et, ABA on oluline hormoon ka osmootsete kohastumiste tagamisel.

### **2.7.3. Osooni katse**

Katsetes kasutatud O<sub>3</sub> kontsentratsioon (400 ppb) oli väga kõrge. Eestis fikseeritakse seirejaamades vaid harva v artusi, mis ületavad 60 ppb ning 2013. aastal oli piirv artuse ületamist kolmes seirejaamas, kõrgeim O<sub>3</sub> kontsentratsioon (63 ppb) mõõdeti Vilsandil (Eesti Keskkonnaseire 2013). Samas polnud katses kasutatud osooni tase ka liialt ebarealistlik, kuna Euroopas ja Põhja-Ameerikas võib kuumalainete ajal kontsentratsioon l hiaajaliselt tõusta 200-400 ppb peale (Ainsworth jt., 2012).

Selgus, et 400 ppb-ga osoneerimisel nii nisu kui ka maisi õhulõhede juhtivused vähenevad. Kui maisil langes juhtivus 33% osoneerimiseelse tasemega võrreldes, siis nisul oli 60 minutit kestnud osoneerimise lõpuks juhtivus vähenenud 67% (Joonis 12 A). On näidatud, et just kumulatiivne O<sub>3</sub>-doos katse esimese poole tunni jooksul määrab lehekahjustuse ulatuse ning on ilmselt seotud ka õhulõhede vastusega osoonile (Brosché jt., 2010). Kuna nisu õhulõhed olid rohkem avatud, oli omandatud osooni doos tal suurem kui maisil ning sellest lähtuvalt ka intensiivsem ja kiirem sulgumine (Joonis 13). Õhulõhede juhtivuse langust on täheldatud nii pideval osoneerimisel madalatel kontsentratsioonidel (Reich and Amundson, 1985) kui ka l hiaajalisel osoneerimisel kõrgetel kontsentratsioonidel (Kollist jt., 2007; Vahisalu jt., 2010). Juhtivuse langust on seostatud osoonistressiga kaasneva fotosünteesi langusega, mille korral tõuseb lehesisene CO<sub>2</sub> kontsentratsioon, mis omakorda annab signaali õhul hedele sulgumiseks

(Reich ja Amundson 1985; Ainsworth jt., 2012). Fotosünteesi langus osoneerimisel leidis kinnitust ka minu katsetes nii nisul kui maisil (Joonis 12B).

Teraviljade õhulõhede vastus osoonile mõnevõrra erines näiteks mudeltaime müürlooga omast. Kui nisul ja maisil langes juhtivus püsivalt, siis müürlooga metsiktüüpidel Col-0 ja Ler pärast esialgset juhtivuse langust see tõusis taas katse-eelsele tasemele ning seejärel langes uuesti, kuid seekord jäädavalt (Kollist jt., 2007; Vahisalu jt., 2010). Sarnast juhtivuse kõikumist nisu ja maisi katsetes ei täheldatud. Samas on võimalik, et siin katsetes kasutatud kõrgemad O<sub>3</sub> kontsentratsioonid indutseerivad teistsuguse õhulõhede vastuse, mis ei võimalda juhtivusel vahepeal taaastuda.

McAdam jt (2017) näitasid hiljuti, et kui osoneerida taimi lühiajaliselt kõrge kontsentratsiooniga (3 minutit ja 400 ppb), siis käivitatakse tekkivate ROS-ide tõttu lehtedes mitte-ensümaatilise ABA sünteesi tema eellastest. Seetõttu pakkusid nad välja, et osoneerimisel indutseeritud õhulõhede sulgumine on põhjustatud hoopis ABAst. Kirjeldatud O<sub>3</sub>-pulsi mõju ABA sünteesile oli liigispetsiifiline ning puudus näiteks hernel. Tomatil seevastu lagunes tekkinud ABA aeglaselt ning juhtivus ka ei taastunud (McAdam jt., 2017). Selline hüpotees sobib minu katseandmetega kokku, kuna püsival osoneerimisel tekib ABA pidevalt juurde, siis ei ole põhjust eeldadagi juhtivuse taastumist katse jooksul. Huvitav on, et maisi õhulõhed ei reageerinud ABAlle, küll aga reageerisid osoonile. McAdam jt (2017) hüpoteesist lähtuvalt pidi sellisel juhul osoneerimisel tekkima ABA kõrgemates kontsentratsioonides kui minu ABA-katses kasutati, tagamaks maisi õhulõhede sugumise. See omakorda viitab, et maisis oli piisavalt erinevaid ABA sünteesi lähteprodukte, millest ROSide vahendusel mitte-ensümaatilisel abstsissiinuse sünteesida. Nende küsimuste vastamiseks oleks jälle vaja nisu ja maisi lehtede ABA sisaldust mõõta enne ja pärast osoneerimist.

Kui muidu saab määrata ka osooni tõttu tekkinud lehekahjustuste ulatust järgnevate päevade jooksul (Brosche jt., 2010), siis katse metoodikast lähtuvalt ei saanud siin töös seda teha, kuna juhtivuse ja fotosünteesi kiiruse arvutamiseks läks vaja teada täpset lehepindala. Seepärast tuligi mõõtekambris olevad lehed lõigata ja pildistada. Saadud katseandmete põhjal võib siiski oletada, et nähtavate lehekahjustuste tekke osas on nisu palju tundlikum osooni suhtes kui mais. Seda esiteks seetõttu, et nisu õhulõhede juhtivus oli viis korda suurem võrreldes maisiga (Joonis 7A), sellest tingituna oli ka lehte sisenenud O<sub>3</sub>-doos nisul palju kõrgem. Teisalt on näidatud, et C<sub>4</sub>-taimedel on võrreldes C<sub>3</sub>-taimedega kõrgemad ROS-e neutraliseerivate ensüümide ehk antioksidantide (näiteks SOD – superoksiidi dismutaas) tasemed, mis võiksid tagada parema kaitse ROSide vastu (Stepien ja Klobus, 2005).

#### 2.7.4. Üldised järeldused

Maisi õhulõhede juhtivus oli normaaltingimustel oluliselt väiksem kui nisul, sellest tulenevalt on maisil kõrgem WUE. Need omadused saab omistada maisi C<sub>4</sub>-fotosünteesist tulenevatele eelistele. Samas fotosünteesi kiirused olid maisil ja nisul normaaltingimustes sarnased. Maisi efektiivsema fotosünteesi näitamiseks võiks katset korrata just kõrgematel temperatuuridel.

Mõlemad teraviljad avasid ja sulgesid õhulõhesid sõltuvalt [CO<sub>2</sub>]-st. Maisi fotosüntees oli tundetum [CO<sub>2</sub>] muutustele ning madalas [CO<sub>2</sub>]-s suutis ta tänu C<sub>4</sub>-fotosünteesile paremini CO<sub>2</sub> omastada. Seevastu kõrges [CO<sub>2</sub>]-s oli nisu fotosünteesi kiirus kõrgem, seetõttu võiks tuleviku kõrgemas [CO<sub>2</sub>]-s nisu saada eelise maisi ees.

Abstsiiishape avaldas mõju nisu õhulõhedele, langetades juhtivust oluliselt juba 10 minutit peale pritsimist. Maisi õhulõhed ABAle ei reageerinud. Katset võiks korrata suuremate ABA kontsentratsioonidega ning hea oleks uurida ka lehesiseseid ABA kontsentratsioonide erinevusi maisil ja nisul.

Osoon avaldas olulist mõju mõlema liigi õhulõhede juhtivusele ja fotosünteesile. Fotosünteesi kiirust vähendas O<sub>3</sub> mõlemal liigil võrdsel määral. Mõju juhtivusele oli tugevam nisu puhul, peamiselt seetõttu, et tema õhulõhed olid rohkem avatud ning lehte sisenenud osooni doos suurem. Sellest lähtuvalt võib oletada, et osoon kahjustab nisu rohkem ning ka lehekahjustuste ulatus võiks olla nisul suurem. Selleks aga peaks kordama katset nii, et saaks võrrelda kahjustusi järgnevatel päevadel.

## KOKKUVÕTE

Mais ja nisu on globaalselt väga olulised teraviljad, kuid nende õhulõhede regulatsiooni ja fotosünteesi, võrreldes mudeltaime *Arabidopsis thaliana*, on uuritud suhteliselt vähem. Käesolevas töös võrreldi nisu ja maisi õhulõhede juhtivust ( $g_s$ ), fotosünteesi kiirust ( $A_{net}$ ) ning veekasutus efektiivsust (WUE) normaaltingimustel. Teiseks uuriti õhulõhede juhtivuse ja fotosünteesi muutumist  $CO_2$  kontsentratsiooni, osooni ja abstsiihappega (ABA) pritsimise toimet.

Katsetest selgus, et normaaltingimustel ( $24^{\circ}C$ ,  $[CO_2]$  400 ppm, ~70% õhuniiskus) on maisi  $g_s$  oluliselt madalam kui nisu, mis tähendab, et tema õhulõhed on rohkem suletud. Sellest lähtuvalt on maisi WUE mitu korda kõrgem, tagades ökonoomsema veekasutuse elutegevuse käigus. Süsihappegaasi kontsentratsiooni muutumisele reageerisid mõlemad liigid, ehkki maisi õhulõhed olid eriti tundlikud  $[CO_2]$  languse suhtes, avanedes kordades rohkem kui nisu.  $[CO_2]$  langeses suudatis mais paremini süsinikku siduda oma  $C_4$  fotosünteesitüübi tõttu, kuid  $[CO_2]$  tõustes oli  $A_{net}$  nisu kõrgem.

Katses kasutatud ABA kontsentratsioon põhjustas nisu olulise õhulõhede juhtivuse languse, kuid maisil reaktsioon ABAlle puudus. See erinevus võib tulla maisi väiksemast tundlikkusest ABAlle ning kõrgemast naturaalsest lehtede ABA kontsentratsioonist.

Osoneerimisel langesid mõlema liigi õhulõhede juhtivused. Võrreldes maisiga, oli nisu sulgumine intensiivsem, mis oli ilmselt seotud kõrgema omandatud  $O_3$ -doosiga.  $A_{net}$  langes mõlemal liigil osoneerimisel võrdselt.

Seega olid nisu ja maisil oma erinevatest fotosünteesitüüpidest tulenevalt erinevused nii normaaltingimuste õhulõhede juhtivuse ja fotosünteesi kiiruse väärtustes kui ka nende tunnuste regulatsioonis uuritud stiimulite ( $[CO_2]$ , kõrge  $O_3$ , ABAGA pritsimine) toimet. Läbiviidud katsed võimaldavad teha järeldusi uuritud liikide  $O_3$ - ja põuatundlikkuse osas, samuti nende edukusest tuleviku kõrge  $[CO_2]$  olukorras.

## SUMMARY

### **Stomatal conductance, its regulation and photosynthesis in *Zea mays* and *Triticum aestivum***

Egon Meigas

#### Summary

Maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*) belong to the trio of most cultivated crops in the world. Considering that the world population is increasing and climate is changing, maize and wheat play an enormous role in maintaining food security and guaranteeing the future of mankind. In the last few decades great progress has been made in understanding the mechanisms of stomatal regulation and involved proteins in the model plant *Arabidopsis thaliana*. However, our most valuable crops are relatively less studied, and it is important to move from model plants to crops.

The aim of this study was to measure and compare stomatal conductance and net assimilation rate of maize and wheat. Furthermore, stomatal and photosynthetic responses of maize and wheat to different stimuli (changes in CO<sub>2</sub> concentration, abscisic acid (ABA) and high levels of ozone) were studied. The selected stimuli are important regulators of stomatal behaviour in *Arabidopsis* and also affect plant yield and drought tolerance.

The results showed lower stomatal conductance and higher water use efficiency of maize compared to wheat in normal conditions. Net carbon assimilation rate (A<sub>net</sub>) was similar between species in normal conditions, whereas maize had higher A<sub>net</sub> in low CO<sub>2</sub> concentration (100 ppm) and wheat had higher A<sub>net</sub> in high concentration (800 ppm). This result suggests that maize has advantages in low CO<sub>2</sub> due to its C<sub>4</sub> photosynthesis, whereas wheat thrives better in high CO<sub>2</sub>. ABA concentration (10 µM) significantly reduced stomatal conductance in wheat, but not in maize. The high level of ozone (400 ppb) used in the experiments caused stomata to close in both species and had a negative effect on A<sub>net</sub>. However obtained O<sub>3</sub>-dose was higher in wheat, indicating that it might be more susceptible to high ozone levels. The results of my study enlighten aspects of stomatal and photosynthetic physiology of two important crops in conditions associated with global climate change.

## **TÄNUAVALDUSED**

Kõige enam tahan tänada oma juhendajat Ebe Merilot kannatlikkuse, nõustamise ning abi eest töö planeerimisel ja koostamisel. Samuti Liis Rüütlit, kes nõustas katsete läbiviimisel. Seejärel tänan Hanna Hõrakut erinevate nippide eest, mis elu lihtsamaks tegid ja Pirko Jalakat, kes samuti aitas aeg-ajalt. Tänan ka ülejäänud laborirahvast meeldiva õhkkonna eest.



## KIRJANDUSE LOETELU

- Ainsworth EA, Yendrek CR, Sitch S, Collins WJ, Emberson LD** (2012) The Effects of Tropospheric Ozone on Net Primary Productivity and Implications for Climate Change. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 637–661
- Assmann SM** (2003) OPEN STOMATA1 opens the door to ABA signaling in Arabidopsis guard cells. *Trends Plant Sci* **8**: 151–153
- Assmann SM, Shimazaki K** (1999) The Multisensory Guard Cell. Stomatal Responses to Blue Light and Abscissic Acid. *Plant Physiol* **119**: 809–816
- Baier M, Kandlbinder A, Gollmack D, Dietz K-J** (2005) Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant Cell Environ* **28**: 1012–1020
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O** (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* **5**: 9
- Brodrick TJ, McAdam SAM** (2013) Unique Responsiveness of Angiosperm Stomata to Elevated CO<sub>2</sub> Explained by Calcium Signalling. *PLOS ONE* **8**: e82057
- Brosché M, Merilo E, Mayer F, Pechter P, Puzõrjova I, Brader G, Kangasjärvi J, Kollist H** (2010) Natural variation in ozone sensitivity among *Arabidopsis thaliana* accessions and its relation to stomatal conductance. *Plant Cell Environ* **33**: 914–925
- Büchsenschütz K, Marten I, Becker D, Philippar K, Ache P, Hedrich R** (2005) Differential expression of K<sup>+</sup> channels between guard cells and subsidiary cells within the maize stomatal complex. *Planta* **222**: 968–976
- C N Gerald, W R Mark, Jawoo K, Richard R, Timothy S, Tingju Z, Claudia R, Siwa M, Amanda P, Miroslav B, et al** (2009) Climate Change: Impact on Agriculture and Costs of Adaptation. *Intl Food Policy Res Inst*
- Chameides WL, Xingsheng L, Xiaoyan T, Xiuji Z, Luo C, Kiang CS, St. John J, Saylor RD, Liu SC, Lam KS, et al** (1999) Is ozone pollution affecting crop yields in China? *Geophys Res Lett* **26**: 867–870
- Consortium (IWGSC) TIWGS** (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* **345**: 1251788
- Cowan IR, Troughton JH** (1971) The relative role of stomata in transpiration and assimilation. *Planta* **97**: 325–336
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscissic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651–679
- Daryanto S, Wang L, Jacinthe P-A** (2016) Global Synthesis of Drought Effects on Maize and Wheat Production. *PLOS ONE* **11**: e0156362
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I** (2013) Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2013.00138

- Ehleringer JR, Sage RF, Flanagan LB, Pearcy RW** (1991) Climate change and the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Trends Ecol Evol* **6**: 95–99
- Feng Z, Paoletti E, Bytnerowicz A, Harmens H** (2015) Ozone and plants. *Environ Pollut* **202**: 215–216
- Finkelstein R** (2013) Absciscic Acid Synthesis and Response. *Arab Book Am Soc Plant Biol*. doi: 10.1199/tab.0166
- Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Mueller ND, O’Connell C, Ray DK, West PC, et al** (2011) Solutions for a cultivated planet. *Nature* **478**: 337–342
- Fowler D, Amann M, Anderson F, Ashmore M, Cox P, Depledge M, Derwent D, Grennfelt P, Hewitt N, Hov O, et al** (2008) Ground-level ozone in the 21st century: Future trends, impacts and policy implications. *R. Soc. Sci. Policy Rep.* 15:
- Geiger D, Maierhofer T, AL-Rasheid KAS, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, et al** (2011) Stomatal Closure by Fast Absciscic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1. *Sci Signal* **4**: ra32-ra32
- Gerland P, Raftery AE, Ševčíková H, Li N, Gu D, Spoorenberg T, Alkema L, Fosdick BK, Chunn J, Lalic N, et al** (2014) World population stabilization unlikely this century. *Science* **346**: 234–237
- Gowik U, Westhoff P** (2011) The Path from C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> Photosynthesis. *Plant Physiol* **155**: 56–63
- Grimes HD, Perkins KK, Boss WF** (1983) Ozone Degrades into Hydroxyl Radical under Physiological Conditions A Spin Trapping Study. *Plant Physiol* **72**: 1016–1020
- Harlan, J.R.**, 1981. The early history of wheat: earliest traces to the sack of Rome, p. 1-19. *In* Evans L.T., Peacock W.J. *Wheat Science-Today and Tomorrow*. Cambridge, 1,
- Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K** (2006) Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO<sub>2</sub>. *Nat Cell Biol* **8**: 391–397
- Hatch MD** (1992) C<sub>4</sub> Photosynthesis: An Unlikely Process Full of Surprises. *Plant Cell Physiol* **33**: 333–342
- Heath OVS** (1948) Control of stomatal movement by a reduction in the normal carbon dioxide content of the air. *Nature* **161**: 179–181
- Heath RL** (1987) The Biochemistry of Ozone Attack on the Plasma Membrane of Plant Cells. *In* JA Saunders, L Kosak-Channing, EE Conn, eds, *Phytochem. Eff. Environ. Compd.* Springer US, pp 29–54
- Hõrak H** (2017) Identification of key regulators of stomatal CO<sub>2</sub> signalling via O<sub>3</sub>-sensitivity. Thesis
- Hõrak H, Kollist H, Merilo E** (2017) Fern stomatal responses to ABA and CO<sub>2</sub> depend on species and growth conditions. *Plant Physiol* pp.00120.2017

- Hörak H, Sierla M, Töldsepp K, Wang C, Wang Y-S, Nuhkat M, Valk E, Pechter P, Merilo E, Salojärvi J, et al** (2016) A Dominant Mutation in the HT1 Kinase Uncovers Roles of MAP Kinases and GHR1 in CO<sub>2</sub>-induced Stomatal Closure. *Plant Cell* tpc.00131.2016
- Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordström M, Böhmer M, Xue S, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI** (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO<sub>2</sub>-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat Cell Biol* **12**: 87–93
- Jia W, Wang Y, Zhang S, Zhang J** (2002) Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J Exp Bot* **53**: 2201–2206
- Kang Y, Khan S, Ma X** (2009) Climate change impacts on crop yield, crop water productivity and food security – A review. *Prog Nat Sci* **19**: 1665–1674
- Keeling CD, Bacastow RB, Bainbridge AE, Jr CAE, Guenther PR, Waterman LS, Chin JFS** (1976) Atmospheric carbon dioxide variations at Mauna Loa Observatory, Hawaii. *Tellus* **28**: 538–551
- Kerstiens G, Lenzian KJ** (1989) Interactions between ozone and plant cuticles. *New Phytol* **112**: 21–27
- Kollist H, Jossier M, Laanemets K, Thomine S** (2011) Anion channels in plant cells. *FEBS J* **278**: 4277–4292
- Kollist H, Nuhkat M, Roelfsema MRG** (2014) Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytol* **203**: 44–62
- Kollist T, Moldau H, Rasulov B, Oja V, Rämme H, Hüve K, Jaspers P, Kangasjärvi J, Kollist H** (2007) A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact *Arabidopsis* and its absence in *abi2* mutant. *Physiol Plant* **129**: 796–803
- Kriedemann PE, Loveys BR, Fuller GL, Leopold AC** (1972) Abscissic Acid and Stomatal Regulation. *Plant Physiol* **49**: 842–847
- Lange OL, Lösch R, Schulze E-D, Kappen L** (1971) Responses of stomata to changes in humidity. *Planta* **100**: 76–86
- LaRosa PC, Hasegawa PM, Rhodes D, Clithero JM, Watad A-EA, Bressan RA** (1987) Abscissic Acid Stimulated Osmotic Adjustment and Its Involvement in Adaptation of Tobacco Cells to NaCl 1. *Plant Physiol* **85**: 174–181
- Larqué-Saavedra A, Wain RL** (1976) Studies on plant growth-regulating substances. XLII. Abscissic acid as a genetic character related to drought tolerance. *Ann Appl Biol* **83**: 291–297
- Lipiec J, Doussan C, Nosalewicz A, Kondracka K** (2013) Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *Int Agrophysics* **27**: 463–477
- Lobell DB, Bänziger M, Magorokosho C, Vivek B** (2011) Nonlinear heat effects on African maize as evidenced by historical yield trials. *Nat Clim Change* **1**: 42–45

- Lupton, F.G.H.** 1987. History of wheat breeding, p. 51-70. *In* Wheat breeding: its scientific basis., Springer Netherlands.
- Lüthi D, Le Floch M, Bereiter B, Blunier T, Barnola J-M, Siegenthaler U, Raynaud D, Jouzel J, Fischer H, Kawamura K, et al** (2008) High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature* **453**: 379–382
- Luwe M** (1996) Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentrations in air. *Plant Cell Environ* **19**: 321–328
- Luwe M, Takahama U, Heber U** (1993) Role of Ascorbate in Detoxifying Ozone in the Apoplast of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaves. *Plant Physiol* **101**: 969–976
- M R Badger, Price and GD** (1994) The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**: 369–392
- Marcussen T, Sandve SR, Heier L, Spannagl M, Pfeifer M, The International Wheat Genome Sequencing Consortium, Jakobsen KS, Wulff BBH, Steuernagel B, Mayer KFX, et al** (2014) Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science* **345**: 1250092
- McAdam EL, Brodribb TJ, McAdam SAM** (2017) Does ozone increase ABA levels by non-enzymatic synthesis causing stomata to close? *Plant Cell Environ* **40**: 741–747
- Mehlhorn H, Tabner BJ, Wellburn AR** (1990) Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone. *Physiol Plant* **79**: 377–383
- Meidner H, Mansfield TA** (1968) Physiology of stomata. McGraw-Hill
- Merilo E, Jõesaar I, Brosché M, Kollist H** (2014) To open or to close: species-specific stomatal responses to simultaneously applied opposing environmental factors. *New Phytol* **202**: 499–508
- Merilo E, Laanemets K, Hu H, Xue S, Jakobson L, Tulva I, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez PL, Schroeder JI, Brosché M, et al** (2013) PYR/RCAR Receptors Contribute to Ozone-, Reduced Air Humidity-, Darkness-, and CO<sub>2</sub>-Induced Stomatal Regulation. *Plant Physiol* **162**: 1652–1668
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R** (2010) AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *Plant J* **63**: 1054–1062
- Morison JIL, Gifford RM** (1983) Stomatal Sensitivity to Carbon Dioxide and Humidity A Comparison of Two C<sub>3</sub> and Two C<sub>4</sub> Grass Species. *Plant Physiol* **71**: 789–796
- Mott KA** (1988) Do Stomata Respond to CO<sub>2</sub> Concentrations Other than Intercellular? *Plant Physiol* **86**: 200–203
- O’Leary MH, Rife JE, Slater JD** (1981) Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochemistry (Mosc)* **20**: 7308–7314
- Pantin F, Monnet F, Jannaud D, Costa JM, Renaud J, Muller B, Simonneau T, Genty B** (2013) The dual effect of abscisic acid on stomata. *New Phytol* **197**: 65–72

- Pell -Eva J., Schlagnhauser CD, Arteca RN** (1997) Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiol Plant* **100**: 264–273
- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, Barnola J-M, Basile I, Bender M, Chappellaz J, Davis M, Delaygue G, et al** (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* **399**: 429–436
- Piperno DR, Flannery KV** (2001) The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2101–2103
- Ranum P, Peña-Rosas JP, Garcia-Casal MN** (2014) Global maize production, utilization, and consumption. *Ann N Y Acad Sci* **1312**: 105–112
- Rao MV, Lee H, Davis KR** (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J* **32**: 447–456
- Rao X, Lu N, Li G, Nakashima J, Tang Y, Dixon RA** (2016) Comparative cell-specific transcriptomics reveals differentiation of C<sub>4</sub> photosynthesis pathways in switchgrass and other C<sub>4</sub> lineages. *J Exp Bot* **67**: 1649–1662
- Raven JA, Edwards D** (2001) Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *J Exp Bot* **52**: 381–401
- Reich PB, Amundson RG** (1985) Ambient levels of ozone reduce net photosynthesis in tree and crop species. *Science* **230**: 566–570
- Ripley BS, Gilbert ME, Ibrahim DG, Osborne CP** (2007) Drought constraints on C<sub>4</sub> photosynthesis: stomatal and metabolic limitations in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> subspecies of *Alloteropsis semialata*. *J Exp Bot* **58**: 1351–1363
- Roelfsema MRG, Levchenko V, Hedrich R** (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J* **37**: 578–588
- Ros R, Muñoz-Bertomeu J, Krueger S** (2014) Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends Plant Sci* **19**: 564–569
- Runeckles VC, Vaartnou M** (1997) EPR evidence for superoxide anion formation in leaves during exposure to low levels of ozone. *Plant Cell Environ* **20**: 306–314
- Sage RF, Monson RK** (1999) C<sub>4</sub> plant biology. Academic Press, San Diego
- Schroeder JI, Hagiwara S** (1990) Repetitive increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca<sup>2+</sup> permeable channels. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 9305–9309
- Shewry PR** (2009) Wheat. *J Exp Bot* **60**: 1537–1553
- Silva RA, West JJ, Zhang Y, Anenberg SC, Lamarque J-F, Shindell DT, Collins WJ, Dalsoren S, Faluvegi G, Folberth G, et al** (2013) Global premature mortality due to anthropogenic outdoor air pollution and the contribution of past climate change. *Environ Res Lett* **8**: 034005

- Slack CR, Hatch MD** (1967) Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses. *Biochem J* **103**: 660–665
- Stepien P, Klobus G** (2005) Antioxidant defense in the leaves of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants under salinity stress. *Physiol Plant* **125**: 31–40
- Swamy PM, Smith BN** (1999) Role of abscisic acid in plant stress tolerance. *Curr Sci* **76**: 1220–1227
- Taiz, L. and Zeiger, E.**, 2002. *Plant Physiology*. 3rd. Ed. Pub. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA
- Turcsányi E, Lyons T, Plöchl M, Barnes J** (2000) Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *J Exp Bot* **51**: 901–910
- Vahisalu T, Kollist H, Wang Y-F, Nishimura N, Chan W-Y, Valerio G, Lamminmäki A, Brosché M, Moldau H, Desikan R, et al** (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**: 487–491
- Vahisalu T, Puzõrjova I, Brosché M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang Y-S, Lindgren O, Salojärvi J, et al** (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* **62**: 442–453
- Van Dingenen R, Dentener FJ, Raes F, Krol MC, Emberson L, Cofala J** (2009) The global impact of ozone on agricultural crop yields under current and future air quality legislation. *Atmos Environ* **43**: 604–618
- Vilela B, Moreno-Cortés A, Rabissi A, Leung J, Pagès M, Lumbreras V** (2013) The Maize OST1 Kinase Homolog Phosphorylates and Regulates the Maize SNAC1-Type Transcription Factor. *PLOS ONE* **8**: e58105
- Xue S, Hu H, Ries A, Merilo E, Kollist H, Schroeder JI** (2011) Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO<sub>2</sub> signal transduction in guard cell. *EMBO J* **30**: 1645–1658
- Zeiger E, Farquhar GD, Cowan IR** (1987) *Stomatal Function*. Stanford University Press
- Ziska LH** (2008) Rising Atmospheric Carbon Dioxide and Plant Biology: The Overlooked Paradigm. *DNA Cell Biol* **27**: 165–172

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://www.ozonelayr.noaa.gov/> **NOAA Stratospheric Ozone Webpage.** – külastatud 26.05.2017

<https://www.idrc.ca/en/article/facts-figures-food-and-biodiversity> **IDRC** – külastatud 26.05.2017

<http://maize.org/why-maize/> **MAIZE/CGIAR** – külastatud 26.05.2017

<https://bloomingplants.files.wordpress.com/2014/02/stomata.jpg?w=300&h=156> – külastatud 26.05.2017

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> **FAOSTAT** – külastatud 26.05.2017

[http://www.keskkonnaagentuur.ee/sites/default/files/eesti\\_keskkonnaseire\\_2013.pdf](http://www.keskkonnaagentuur.ee/sites/default/files/eesti_keskkonnaseire_2013.pdf) **Eesti Keskkonnaseire 2013** – külastatud 26.05.2017

<http://www.un.org/en/development/desa/news/population/2015-report.html> **UN DESA Carbon Cycle Science** – külastatud 26.05.2017

<https://www.esrl.noaa.gov/research/themes/carbon/#why> **USDOC/ESRL Global Greenhouse Gas Reference Network** – külastatud 26.05.2017

<https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/> **USDOC/ESRL** – külastatud 26.05.2017

# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Egon Meigas

(sünnikuupäev: 16.06.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**Nisu ja maisi õhulõhede juhtivuse, regulatsiooni ning fotosünteesi võrdlev analüüs,**  
mille juhendaja on Ebe Merilo

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2017